

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**

MICHELE RIBEIRO ROSAS

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS CONTENDO
COMPOSTOS BIOATIVOS DAS CASCAS DE *Euphorbia umbellata* (PAX) BRUYNS
(JANAÚBA).**

PONTA GROSSA

2019

MICHELE RIBEIRO ROSAS

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS CONTENDO
COMPOSTOS BIOATIVOS DAS CASCAS DE *Euphorbia umbellata* (PAX) BRUYNS
(JANAÚBA).**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame.

Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Bonametti Olivato.

PONTA GROSSA

2019

R789 Rosas, Michele Ribeiro
Desenvolvimento de filmes biodegradáveis contendo compostos bioativos das cascas de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Janaúba) / Michele Ribeiro Rosas. Ponta Grossa, 2019.
79 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Área de Concentração: Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame.
Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Bonametti Olivato.

1. Embalagem ativa. 2. Amido de mandioca. 3. Janaúba. 4. Atividade antioxidante. 5. Atividade antimicrobiana. I. Beltrame, Flávio Luís. II. Olivato, Juliana Bonametti. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ciências e Tecnologia de Alimentos. IV.T.

CDD: 664

TERMO DE APROVAÇÃO

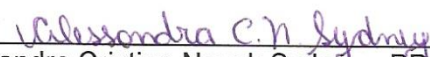
MICHELE RIBEIRO ROSAS



Desenvolvimento de embalagem biodegradável contendo compostos bioativos das cascas de *Euphorbia umbellata* (PAX) BRUYNS

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: 
Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame - DEFAR/UEPG - PR


Prof.^a. Dr.^a. Alessandra Cristine Novak Sydney - PPGBIOTEC/UTFPR - PR


Prof.^a. Dr.^a. Priscileila Colerato Ferrari - DEFAR/UEPG - PR

Ponta Grossa, 28 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao Senhor meu Deus, por confiar a mim esta oportunidade, amparando-me e abençoando-me a cada dia.

Ao meu esposo Edson Fernando Rosas e meu amado filho Arthur Fernando Ribeiro Rosas, que sempre acreditaram em mim, por todos os esforços, incentivos, orações, dificuldades enfrentadas, compreensão e pelo amor incondicional.

Aos meus pais Eziquel Ribeiro e Roseli Prestes Ribeiro pela minha vida, pelo amor, por todo o apoio, incentivo e orações.

Aos meus irmãos, Jean Carlos Ribeiro e Tatiane Ribeiro Gonçalves Ferreira, aos meus cunhados, Mayara Cristina Gonçalves Machado Padilha e Jader Augusto Gonçalves Ferreira, aos meus sobrinhos Rafael Ribeiro Gonçalves Ferreira e Suri Cristina Machado Ribeiro, pelo amor, carinho, companheirismo e laço de união que sempre nos acompanha.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame, pelos ensinamentos, paciência, entusiasmo e confiança transmitidos, e principalmente pela oportunidade de ser sua orientada.

À minha coorientadora, Prof^a Dr^a. Juliana Bonametti Olivato, por sua paciência e conhecimentos compartilhados, palavras incentivadoras e confiança.

Ao Prof Luís Antônio Esmerino pelo auxílio na realização dos experimentos, pelo conhecimento transmitido e serenidade.

Aos professores Dr. Alessandro Nogueira e Dr^a. Aline Alberti pelo auxílio na realização dos experimentos.

À Prof^a Dr^a. Priscileila Colerato Ferrari pelo carisma e pelo auxílio na interpretação de resultados.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelos ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório M 23, Bruna Mikullis Lemes, Bruno Rodrigo Minozzo, Luíza Stolz Cruz, Anna Kpot, Kevin Antunes, Evelyn Assis de Andrade, Aline da Silva Justo, Bruna Nunes, Francieli Kanumfre de Carvalho, Laura Stolz Cruz, Alexandre Alves de Oliveira, pelo convívio do dia a dia, pela paciência, por me ajudarem nos experimentos realizados, por me auxiliarem nas interpretações de resultados, pelas conversas e risadas que tornaram meus dias de trabalho mais agradáveis.

Às minhas amigas e colegas de profissão Flávia de Brito Pedroso e Patrícia Bubna Biscaia pelo incentivo, por me auxiliarem nas interpretações de resultados e conhecimentos compartilhados.

À técnica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Maria Aparecida Ribeiro da Luz pela amizade, pelas conversas e pelo auxílio.

Às colegas do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Amanda Alves Prestes, Débora Gonçalves Bortolini e Rafaela Gomes da Silva, pelo auxílio na realização dos experimentos.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários, da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários- SEBISA, da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Existe uma crescente preocupação relacionada com a quantidade de lixo produzida a partir de embalagens não biodegradáveis. O grande consumo dessas intensifica sua produção, gerando mais resíduos. A utilização de polímeros biodegradáveis a partir de fontes renováveis torna-se uma alternativa a esta problemática. A incorporação de substâncias antioxidantes em filmes plásticos, como extratos vegetais ricos em componentes antioxidantes e antimicrobianos, para a proteção e manutenção da qualidade de alimentos, tem sido pesquisada devido a sua abundância na natureza. Este trabalho teve como objetivo propor o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis ativas formuladas com amido de mandioca, glicerol e extratos das cascas de *Euphorbia umbellata* (conhecida como Janaúba), e posteriormente avaliar o material obtido através da caracterização em relação à espessura, solubilidade, densidade, opacidade, análise termogravimétrica (TGA), microscopia eletrônica de varredura (FEG), determinação de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante (DPPH[•], ABTS^{•+} e FRAP) e atividade antimicrobiana. Para tanto, inicialmente foram realizadas a extração das frações das cascas da *Euphorbia umbellata* (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) e realizada a determinação quantitativa dos compostos fenólicos, atividade antioxidante (DPPH[•], ABTS^{•+} e FRAP) e atividade antimicrobiana das frações. A quantificação de fenólicos revelou que a fração acetato é a que possui maior quantidade desses compostos ($515,81 \pm 0,02$ mgGAE/g), melhor atividade antioxidante frente os experimentos de DPPH[•] ($1,95 \pm 0,00$ IC₅₀µg/mL), ABTS^{•+} ($1,40 \pm 0,15$ IC₅₀µg/mL) e FRAP ($2680,05 \pm 0,02$ µmolTE/g), e grande potencial antimicrobiano contra as cepas de microrganismos testados (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella enterica* ATCC 14028). Estes resultados demonstram que essa fração mostra-se promissora para incorporação ao filme de amido de mandioca. Os resultados demonstraram que a incorporação da fração acetato das cascas da *Euphorbia umbellata* aos filmes influenciou na espessura, solubilidade, densidade, opacidade e índice de branquura. A análise térmica (TGA) dos filmes demonstrou a diminuição da temperatura de degradação das matrizes poliméricas. A avaliação microscópica dos filmes permitiu determinar que, devido a adição da fração acetato, ocorreu uma alteração na regularidade da matriz polimérica, e a superfície do filme tornou-se mais heterogênea. Em todos os filmes produzidos com a adição da fração acetato pode-se observar o desenvolvimento de atividade antioxidante (DPPH[•], ABTS^{•+} e FRAP), efeito este proporcional às concentrações utilizadas da fração. Os filmes de amido incorporados com as diferentes concentrações da fração acetato das cascas da *Euphorbia umbellata* obtiveram resultados positivos para atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar, apresentando formação de zonas de inibição para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e para as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, e não apresentaram zonas de inibição para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella enterica* ATCC 14028. Pode-se concluir que os filmes biodegradáveis a base de amido de mandioca, incorporados com o extrato das cascas da *Euphorbia umbellata*, apresentam propriedades bioativas e características físico-químicas adequadas se constituindo em uma alternativa interessante para a produção e aplicação em embalagens para alimentos.

Palavras-Chave: Embalagem ativa, Amido de mandioca, Janaúba, Atividade antioxidante, Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

There is a growing concern about the amount of waste produced from non-biodegradable packaging. Their high consumption intensifies its production, which generate more waste. The use of biodegradable polymers from renewable sources becomes an alternative to this problem. The incorporation of antioxidant substances into plastic films, such as plant extracts rich in antioxidant and antimicrobial components, for the protection and maintenance of food quality, has been researched due to its abundance in nature. The objective of this work was developed active biodegradable packaging formulated with cassava starch, glycerol and extracts of *Euphorbia umbellata* bark (known as Janaúba), and after, evaluate the obtained material by their thickness, solubility, density, opacity, thermogravimetric analysis (TGA), scanning electron microscopy (FEG), determination of total phenolic compounds, antioxidant activity (DPPH •, ABTS • + and FRAP) and antimicrobial activity. *Euphorbia umbellata* (hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol) fractions were initially extracted and the quantitative determination of the phenolic compounds, antioxidant activity (DPPH •, ABTS • + and FRAP) and antimicrobial activity of fractions was performed. The phenolic quantification revealed that the acetate fraction had the highest amount of these compounds (515.81 ± 0.02 mgGAE / g), better antioxidant activity against the DPPH experiments (1.95 ± 0.00 IC 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$), and higher antimicrobial potential against the strains of microorganisms tested (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Salmonella enterica* ATCC 14028). These results demonstrated that this fraction was promising for incorporation into the cassava starch film. The results showed that the incorporation of the acetate fraction of the *Euphorbia umbellata* peel into the films influenced their thickness, solubility, density, opacity and whiteness index. The thermal analysis (TGA) of the films showed lower degradation temperature of the polymer matrices with the addition of acetate fraction. The microscopic evaluation of the films showed that, due the addition of the acetate fraction, a change in the regularity of the polymer matrix occurred and the film surface became more heterogeneous. For all the films produced with the addition of the acetate fraction, the development of antioxidant activity (DPPH •, ABTS • + and FRAP) could be observed, which was proportional to the concentration of the fraction used. The starch films, incorporated with different concentrations of acetate fraction of the *Euphorbia umbellata* bark, showed positive results for the antimicrobial activity measured by diffusion method in agar, presenting zones of inhibition for *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and for *Escherichia coli* ATCC 25922, and did not presenting zones of inhibition for *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Salmonella enterica* ATCC 14028. Based on this, is possible conclude that the biodegradable cassava starch-based films, incorporated with the *Euphorbia umbellata* bark extract, presented bioactive properties and physicochemical characteristics suitable alternative for the production and application in food packaging.

Key words: Active packaging, Cassava starch, Janaúba, Antioxidant activity, Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos grânulos de amido.....	20
Figura 2 - <i>Euphorbia umbellata</i> (Pax) Bruyns no habitat	23
Figura 3 - Exemplos representativos de compostos fenólicos.....	25
Figura 4 - Fluxograma das atividades da etapa experimental	30
Figura 5 - (A) Extrator de Soxhlet, (B) rotaevaporador	32
Figura 6 - Produção dos filmes pela técnica de <i>casting</i>	38
Figura 7 - (A) Filme amido + glicerol (FB) e (B) Filme amido + glicerol + FA das cascas da <i>Euphorbia</i>	53
Figura 8 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas para a superfície de fratura das amostras.....	54
Figura 9 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas da superfície das amostras (Ampliação 800 x).....	55
Figura 10 - (A) Análise termogravimétrica e (B) curvas DTG dos filmes.....	56
Figura 11 - Compostos fenólicos liberados dos filmes.....	58
Figura 12 - Ação <i>scavenger</i> dos filmes sobre ABTS ^{•+}	61
Figura 13 - Ação <i>scavenger</i> dos filmes sobre DPPH [•]	62
Figura 14 - A atividade antioxidante dos filmes frente ao método FRAP	63
Figura 15 - Ágar Muller-Hinton semeadas com <i>Staphylococcus aureus</i> e discos de 8mm dos filmes. Resultado	64
Figura 16 - Ágar Muller-Hinton semeadas com <i>Staphylococcus aureus</i> e discos de 8mm dos filmes resultado	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes e quantidades utilizados na formulação dos filmes	37
Tabela 2 - Atividade antioxidante e compostos fenólicos das frações das cascas da <i>Euphorbia umbellata</i>	44
Tabela 3 - Atividade antimicrobiana – CIM das frações das cascas da <i>Euphorbia umbellata</i>	46
Tabela 4 - Composição centesimal do amido de mandioca.....	48
Tabela 5 - Densidade, espessura e solubilidade dos filmes.....	50
Tabela 6 - Análise de cor, índice de brancura e opacidade aparente dos filmes	51
Tabela 7 - Quantificação de compostos fenólicos dos filmes	57
Tabela 8 - Atividade Antioxidante dos filmes.....	60
Tabela 9 - Resultados observados para a Atividade Antimicrobiana dos filmes pelo método de difusão em ágar.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácidosulfônico)

ANOVA Análise de variância

CIM Concentração Inibitória Mínima

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DMSO Dimetilsulfoxido

DP Desvio padrão

DPPH[•] 2,2-difenil-1-picrilidrazilo Sigma-Aldrich[®]

DRX Difração de Raios X (*X Ray Diffraction*)

DTG Derivada Termogravimetria

EB Extrato bruto das cascas da *Euphorbia umbellata*

F2,5FA Filme de amido de mandioca com 2,5% da fração acetato de etila do extrato das cascas da *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, em relação à massa de amido (m/m)

F5FA Filme de amido de mandioca com 5% da fração acetato de etila do extrato das cascas da *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, em relação à massa de amido (m/m)

F10FA Filme de amido de mandioca com 10 % da fração acetato de etila do extrato das cascas da *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, em relação à massa de amido (m/m)

FA Fração acetato de etila do extrato das cascas da *Euphorbia umbellata*

FB Filme base de amido de mandioca sem (FA)

FCI Fração clorofórmio do extrato das cascas da *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns

FEG Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (*Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy*)

FH Fração hexânica do extrato das cascas da *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns

FM Fração metanólica do extrato das cascas da *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns

FRAP Potencial Antioxidante Redutor Férrico (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

FTIR Espectroscopia de Infravermelho por Transformada em Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

IB Índice de brancura

RMN Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*)

TE Trolox equivalente

TGA Análise termogravimétrica

TPTZ 2, 4, 6 solução de tripiridil-s-triazina, Sigma-Aldrich®

TTC Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 GERAL.....	16
2.2 ESPECÍFICOS.....	16
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1 Embalagens biodegradáveis.....	17
3.2 Embalagens ativas.....	18
3.3 Amido.....	19
3.4 Amido de mandioca.....	21
3.5 Filmes de amido.....	21
3.6 <i>Euphorbia umbellata</i> (PAX) BRUYNS.....	23
3.7 Compostos fenólicos.....	24
3.8 Atividade antioxidante.....	26
3.9 Atividade antimicrobiana.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Coleta, identificação e processamento do material vegetal.....	30
4.2 Obtenção das frações das cascas de <i>Euphorbia umbellata</i>	31
4.3 Estudo da atividade antioxidante.....	32
4.3.1 Ação <i>scavenger</i> sobre ABTS ^{•+}	32
4.3.2 Ação <i>scavenger</i> sobre DPPH [•]	33
4.3.3 Determinação do poder de redução do íon ferro FRAP.....	33
4.4 Determinação de compostos fenólicos nas frações.....	33
4.5 Atividade Antimicrobiana.....	34
4.5.1 Preparo das concentrações das frações.....	34
4.5.2 Preparo dos microrganismos.....	34
4.5.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	35
4.6 Caracterização físico-química (composição centesimal) do amido de mandioca.....	35
4.6.1 Umidade.....	35
4.6.2 Resíduo mineral bruto (cinzas).....	35
4.6.3 Lipídeos.....	36
4.6.4 Proteínas pelo Método de Kjeldahl (Nitrogênio total).....	36

4.6.5 Acidez	37
4.7 Preparo dos Filmes por <i>casting</i>	37
4.8 Caracterização dos filmes	38
4.8.1 Análise de cor	38
4.8.2 Opacidade aparente.....	39
4.8.3 Solubilidade	39
4.8.4 Densidade.....	39
4.8.5 Espessura	40
4.8.6 Microestrutura.....	40
4.8.7 Análise termogravimétrica (TGA).....	40
4.8.8 Atividade Antioxidante dos filmes	40
4.8.8.1 Preparo das amostras.....	40
4.8.8.2 Ação <i>scavenger</i> sobre ABTS ^{•+}	41
4.8.8.3 Ação <i>scavenger</i> sobre DPPH [•]	41
4.8.8.4 Determinação do poder de redução do íon ferro FRAP.....	42
4.8.8.5 Determinação de compostos fenólicos nos filmes	42
4.8.9 Atividade Antimicrobiana.....	43
4.8.9.1 Método Difusão em ágar.....	43
4.10 Análise estatística	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Compostos fenólicos e Atividade Antioxidante das frações das cascas da <i>Euphorbia umbellata</i>	44
5.2 Atividade Antimicrobiana das frações das cascas da <i>Euphorbia umbellata</i>	46
5.2.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	46
5.3 Caracterização físico-química (composição centesimal) do amido de mandioca	47
5.4 Caracterização dos filmes	49
5.4.1 Caracterização dos filmes quanto à densidade, espessura e solubilidade.....	49
5.4.2 Análise de cor e opacidade aparente.....	51
5.4.3 Determinação Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (<i>Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy</i>) (FEG).....	53
5.4.4 Análise termogravimétrica (TGA).....	56
5.4.5 Determinação de compostos fenólicos liberados dos filmes	57
5.4.6 Atividade Antioxidante dos Filmes: ABTS ^{•+} , DPPH [•] e FRAP.....	59
5.4.7 Atividade Antimicrobiana - Método Difusão em Ágar	64

6	CONCLUSÕES	68
7	SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, devido as crescentes cuidados com a saúde dos consumidores, preocupações em relação à segurança alimentar e questões relacionadas ao meio ambiente, houve um grande interesse no desenvolvimento de embalagens ativas de alimentos baseadas em materiais biodegradáveis que favoreçam a conservação de alimentos, juntamente com o fornecimento de uma propriedade de barreira eficaz (RIAZ et al., 2018).

As embalagens plásticas que são constituídas de polímeros sintéticos derivados do petróleo representam nos dias atuais os principais materiais utilizados para embalar alimentos. Isto se deve ao baixo custo de produção, às características de impermeabilidade, flexibilidade e resistência ao impacto desses materiais; entretanto o tempo médio de degradação é elevado, sendo a quantidade de lixo produzida a partir dos materiais confeccionados com esses polímeros não biodegradáveis um problema crescente no mundo. Além do mais, o aumento do consumo desses materiais intensifica a demanda da produção, e como consequência são gerados mais resíduos com o passar dos anos (BRASIL, 2017).

Acrescenta-se a isso, o fato de que muitas dessas embalagens podem conter restos de alimentos e, por isso, não devem ser direcionadas para a reciclagem sem que seja feita uma prévia triagem e limpeza. Como consequência, milhares de toneladas de embalagens plásticas não biodegradáveis são depositadas em aterros, aumentando todos os anos a quantidade de resíduos no meio ambiente (DE LÉIS et al., 2017).

Deve-se destacar que as fontes de petróleo não são renováveis, fazendo necessária a busca por alternativas a essa matéria prima, com o desenvolvimento de materiais a serem utilizados como substitutos para o preparo das embalagens. Os filmes biodegradáveis de polissacarídeos, obtidos de fonte renovável, são os produtos mais comumente utilizados na produção de embalagens biodegradáveis (KASEEM; HAMAD; DERI, 2012); são obtidos de diferentes fontes vegetais, sendo o amido um dos elementos mais promissores como matéria prima para a confecção de embalagens, pois alia manejo do ciclo de carbono com disponibilidade, baixo custo e bom desempenho na produção (GALGANO et al., 2015; SIRACUSA et al., 2008).

Para melhorar as propriedades mecânicas dos filmes de amido, durante o processo de produção, são adicionados plastificantes (glicerol, sorbitol, por exemplo), que interagem com as cadeias de amido através de ligações de hidrogênio, aumentando a mobilidade das cadeias. A técnica do tipo *casting* pode ser utilizada para a confecção de filmes a base de amido, onde

a amilose e amilopectina se dispersam na solução aquosa, ocorrendo gelatinização térmica dos grânulos em excesso de água e as estruturas se reorganizam durante o processo de secagem, formando uma matriz contínua que dá origem aos filmes (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010). Estudos vêm sendo realizados avaliando a adição de diversas matérias-primas, bem como utilizando diferentes processos de obtenção de filmes à base de amido, com o intuito de desenvolver uma nova formulação que satisfaça as necessidades do mercado.

A preocupação em prevenir a perda dos alimentos, por deterioração química ou microbiológica, ressalta o interesse em desenvolver embalagens ativas, que além de preservar o alimento embalado, ainda apresentam uma funcionalidade adicional de interagirem com o alimento (MARCOS et al., 2014). Diferentes compostos podem ser incorporados aos filmes, visando promover um novo meio para a melhoria da segurança, da vida útil e até mesmo das propriedades dos alimentos. Dentre eles estão compostos bioativos, podendo ser substâncias naturais, como extratos vegetais apresentando atividade antioxidante e antimicrobiana (LECETA et al., 2013; AVELLA et al., 2005; KAHKONEN et al., 1999). Resultados de teor de fenólicos totais, atribuídos a diferentes espécies do gênero *Euphorbia*, como *Euphorbia denticulata*, *Euphorbia royleana*, demonstraram que os resultados para compostos fenólicos apresentaram correlação com os resultados da atividade antioxidante (ZENGIN et al., 2017; ASHRAF et al., 2015). Nessa direção, membros do gênero *Euphorbia* poderiam ser considerados fontes valiosas como componentes bioativos.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como foco principal o estudo para o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis ativas formuladas com amido de mandioca, glicerol e extrato das cascas de *Euphorbia umbellata* (Euphorbiaceae), que é uma planta com potencial de pesquisa (MWINE; VAN DAMME, 2011). Os filmes produzidos serão caracterizados avaliando suas propriedades estruturais por meio de análises espectroscópicas e espectrométricas, assim como suas propriedades térmicas, ópticas, de barreira, avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver e analisar embalagens biodegradáveis tendo como base o amido de mandioca e incorporadas com extrato de cascas de *Euphorbia umbellata*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Obter as frações (hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica) das cascas da *Euphorbia umbellata* utilizando extração por Soxhlet;
- Quantificar o conteúdo de fenólicos totais e avaliar as propriedades antioxidantes e antimicrobianas presentes nas frações (hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica) das cascas de *Euphorbia umbellata*;
- Caracterizar o amido de mandioca quanto à umidade, teor de minerais, lipídeos, proteínas e acidez;
- Produzir filmes biodegradáveis de amido de mandioca contendo extrato liofilizado da fração biologicamente mais ativa das cascas de *Euphorbia umbellata*;
- Caracterizar os filmes obtidos por microscopia eletrônica de varredura (FEG), análise térmica (TGA), determinação de espessura, densidade, solubilidade, cor e opacidade aparente.
- Quantificar o conteúdo de fenólicos totais e caracterizar as propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos filmes contendo extrato liofilizado;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Embalagens biodegradáveis

A conscientização ambiental e o longo período de degradação de materiais poliméricos derivado do petróleo estão forçando a pesquisa por novos produtos para acondicionamento (GALGANO et al., 2015). Ao contrário das embalagens sintéticas, as embalagens biodegradáveis com característica de atividade têm a capacidade de alterar a composição e as qualidades sensoriais dos alimentos. A prevenção da poluição ambiental incentivou indústrias e pesquisas acadêmicas para o desenvolvimento de embalagens biodegradáveis, aliando a possibilidade de combinar biodegradabilidade com redução de resíduos (KASEEM; HAMAD; DERI, 2012).

A utilização de polímeros biodegradáveis obtidos a partir de fontes renováveis torna-se uma alternativa viável a indústria de embalagens, pois tais componentes podem passar pelo processo de biodegradação. Esse processo é considerado a rota mais segura para tratamento de resíduos, pois permite a quebra das cadeias poliméricas em tamanhos reduzidos, resultando em micromoléculas que são facilmente absorvidas pelos microrganismos do solo (DAVIS; SONG, 2006).

Os materiais biodegradáveis são em grande parte baseados em polissacarídeos, pois geralmente são barreiras não tóxicas e efetivas ao oxigênio e ao dióxido de carbono, mantendo a qualidade dos alimentos e, ao mesmo tempo, reduzindo o impacto ambiental dos resíduos de embalagens (LECETA et al., 2013).

Os biopolímeros, como os polissacarídeos, são moléculas de cadeia longa de ocorrência natural. No entanto, de um modo geral, os biopolímeros obtidos de fontes naturais apresentam propriedades mecânicas muito inferiores em relação aos preparados a partir de materiais derivados do petróleo, necessitando, assim, de melhorias significativas nessas e em outras propriedades.

Nos últimos anos, os polímeros biodegradáveis como o amido, têm sido estudados extensivamente como um material potencial para a produção de embalagens. Para alguns alimentos, como por exemplo, os vegetais frescos, os polímeros biodegradáveis são bem adequados, devido à importância de prevenir a desidratação desses alimentos (NOURI; NAFCHI, 2014). Filmes ativos elaborados à base de biopolímeros podem atuar como barreira ao vapor de água, a gases, proteção mecânica contra deterioração e ainda possibilitar a

incorporação de aditivos funcionais, como antioxidantes e agentes antimicrobianos, além de estender a vida útil dos alimentos (GOMEZ-ESTACA et al., 2014).

O resultado da ampla gama de aplicações de amido, derivada principalmente do surgimento da indústria de embalagens e do aumento da disponibilidade de amido, torna crescente o interesse em utilizá-lo como um potencial substituto para materiais de embalagem sintéticos convencionais, na formação de filmes biodegradáveis (GARCIA et al., 2009). Materiais à base de polissacarídeos têm sido amplamente utilizados na indústria alimentícia como embalagens e revestimentos comestíveis.

3.2 Embalagens ativas

A embalagem é um elemento fundamental de quase todos os produtos alimentícios tendo como funções proteger o conteúdo contra o ambiente externo, manter a qualidade do produto durante o armazenamento e prolongar a sua vida útil (LECETA et al., 2013). Compostos biologicamente ativos, como antioxidantes, vitaminas, agentes antimicrobianos e agentes aromatizantes, podem ser incorporados à embalagem para dar ao sistema uma característica ativa (NOURI; NAFCHI, 2014).

A embalagem ativa é uma nova tecnologia que altera a embalagem ou o revestimento de forma a produzir efeito positivo sobre a saúde do consumidor. Estas embalagens possuem a capacidade de eliminar o oxigênio, controlar a umidade, absorver e liberar odores e sabores, gerar e absorver dióxido de carbono, liberar agentes antioxidantes e antimicrobianos. Estes aspectos levam ao aumento da vida útil dos alimentos, reduzindo perdas econômicas e evitando a deterioração dos alimentos (LECETA et al., 2013).

A embalagem ativa apresenta ainda a vantagem de possibilitar uma liberação controlada dos ativos, pois estes não são adicionados diretamente ao alimento (MARCOS et al., 2014). A incorporação de substâncias naturais aos filmes plásticos, como extratos vegetais ou substâncias naturais isoladas para a proteção e manutenção de alimentos, tem sido pesquisada devido à sua abundância na natureza (LECETA et al., 2013; AVELLA et al., 2005; KAHKONEN et al., 1999).

A oxidação lipídica que ocorre nos produtos alimentícios, especialmente aqueles com alto grau de insaturação como óleos vegetais e de peixe e carne ou produtos da pesca, são responsáveis por odores e sabores desagradáveis nos produtos, com consequente diminuição da segurança e qualidade nutricional. Para tanto, têm sido desenvolvidas embalagens

alimentícias com o intuito de manter a preservação das características do alimento, controle e absorção de umidade, ocorrendo dessa maneira a incorporação de aditivos antimicrobianos e antioxidantes (GOMEZ-ESTACA et al., 2014; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010). A liberação de antioxidantes da embalagem alimentícia para o alimento durante a comercialização do produto é de grande interesse para a tecnologia de alimentos, uma vez que esse processo pode reduzir a oxidação lipídica, processo intimamente ligado ao processo de deterioração dos alimentos (BARBOSA-PEREIRA et al., 2013).

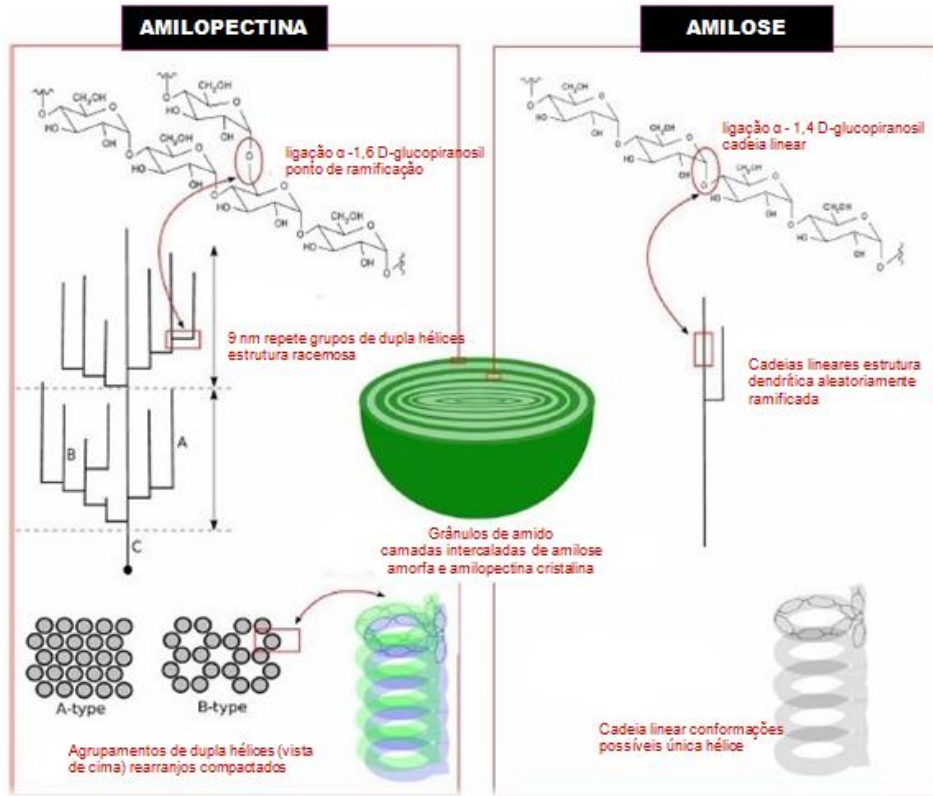
3.3 Amido

O amido é um polímero natural que apresenta características promissoras para aplicações tecnológicas (GALGANO et al., 2015; SIRACUSA et al., 2008), pois é um dos polissacarídeos naturais mais abundantes, baratos e biodegradáveis, encontrado na natureza, representando uma alternativa na composição de embalagens biodegradáveis (KASEEM; HAMAD; DERI, 2012).

O amido é semicristalino, armazenado em grânulos como substância de reserva na maioria das plantas, insolúvel em água fria, álcool e éter e é um carboidrato não redutor, formado por duas macromoléculas: amilose que apresenta uma estrutura basicamente linear de unidades de α -1,4 D-glucopiranosil e amilopectina, a qual apresenta estrutura ramificada com unidades de α -1,6 D-glucopiranosil (POKHREL, 2015). A quantidade relativa de amilose e amilopectina depende da fonte botânica (AVELLA et al., 2005).

Os grânulos de amido são compostos de anéis de crescimento concêntricos e intercalados de amilose e amilopectina. Na amilopectina, as estruturas helicoidais são estabilizadas pela formação de duplas hélices que dão origem às propriedades semicristalinas dos grânulos (RAGUIN; EBENHOH, 2017). Os grânulos de amido apresentam camadas intercaladas no anel de crescimento, a camada amorfa (amilose) e camada cristalina (amilopectina). Exibem uma estrutura de amilopectina densamente empacotada e organizada com repetições internas de 9 nm dos grupos de duplas hélices, resultando em um arranjo compacto formadas entre as cadeias α -1,4, caracterizando arranjos mais compactos (tipo A ou tipo B) (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura dos grânulos de amido



Fonte: Adaptado de Raguin e Ebenhoh, 2017.

Os amidos nativos, sem modificação, contêm entre 15% e 45% de material cristalino. Dependendo do seu padrão de difração de raios X, os amidos são categorizados em três tipos cristalinos chamados A, B e C. O padrão A é característico de amidos de cereais, o padrão B de amidos de tubérculos e, o padrão C, intermediário entre o A e o B, característico de amido de leguminosas. Também já foi identificado o amido classificado como tipo V, obtido como resultado de amilose complexada com outras substâncias como iodo, gordura, emulsionantes (KIM; PARK; LIM, 2015).

O aquecimento de suspensões de amido, em excesso de água e a altas temperaturas (entre 65 e 100°C aproximadamente dependendo do tipo de amido), provoca um processo irreversível de gelatinização (JIMÉNEZ; FABRA; TALENS, 2012). Durante o processo de gelatinização, ocorre a ruptura da estrutura cristalina do amido, expondo seus grupos hidroxila e causando um aumento do intumescimento e solubilidade da cadeia.

A formação do gel ocorre, principalmente, por retrogradação dos polímeros de amido solubilizados depois de gelatinizados e acontece rapidamente com polímeros de cadeia linear (COPELAND et al., 2009). Assim, a estrutura linear da amilose possibilita uma melhor

formação do gel depois do grânulo de amido ter sido gelatinizado; tal característica se torna mais evidente naqueles amidos cujos teores de amilose são maiores.

3.4 Amido de mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pertence à família Euphorbiaceae; é conhecida como tapioca, aipim, macaxeira, entre outros, e é originária da América do Sul. Suas raízes podem ser aproveitadas de diversas maneiras para alimentação humana, assim como sua produção e seus subprodutos fornecem uma oportunidade para desenvolver produtos de valor para uso alimentares e industriais (TEIXEIRA et al., 2012).

O Estado do Paraná é responsável por 70% da produção brasileira de amido de mandioca, produzindo 333,36 toneladas anuais, tornando-se uma fonte industrial potencialmente importante e que pode ser utilizado nas indústrias farmacêutica, de embalagem e têxtil (ABAM, 2013; BENESI et al., 2004).

O amido de mandioca é uma boa matéria-prima para a elaboração de filmes plásticos, pois apresenta uma baixa temperatura de gelatinização (em torno de 60 °C), forma géis transparentes e estáveis (dependentes da quantidade de amilose, do grau de cristalinidade e do comprimento das cadeias de amilopectina), e também devido às suas características atrativas como ser inodoro, incolor, atóxico, insípido, abundante e biodegradável (PIÑEROS - HERNANDEZ et al., 2017; MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

3.5 Filmes de amido

A utilização apenas do amido como material de embalagem não é recomendada, devido principalmente as suas propriedades mecânicas deficientes e a sua natureza hidrofílica, sendo muitas vezes modificados, mecânica, física e quimicamente ou até mesmo sendo feitas combinações com plastificantes ou aditivos poliméricos para melhorar essas características (DAVIS; SONG, 2006). Sendo assim, o amido pode ser utilizado na produção de embalagens e itens de descarte rápido, além de blendas e compósitos com polímeros sintéticos na confecção de filmes flexíveis (NOURI; NAFCHI, 2014).

As características dos filmes a base de amido variam em função do tipo de amido utilizado, do teor de amilose, do teor de plastificante, das condições de processamento e da umidade. Filmes biodegradáveis contendo apenas amido apresentam baixa permeabilidade a

gases, entretanto apresentam limitações nas propriedades mecânicas e alta suscetibilidade à água (GALGANO et al., 2015). Para que o amido comporte-se como um material termoplástico, a adição de um plastificante é essencial (RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2004). Os plastificantes mais indicados para serem empregados em filmes de amido são os polióis, como o glicerol, devido ao seu alto ponto de ebulição, disponibilidade e baixo custo (KASEEM; HAMAD; DERI, 2012). A cristalinidade do filme é substancialmente afetada dependendo do plastificante utilizado. O glicerol, como plastificante, diminui a cristalização devido à mobilização das cadeias e estabilização da água. (MOŚCICKI et al., 2012). O papel dos plastificantes é desestruturar o grânulo de amido quebrando ligações de hidrogênio entre as macromoléculas elevando a uma despolimerização parcial do mesmo (REN et al., 2009).

As propriedades físico-químicas dos filmes de amido apresentam grande variabilidade dependendo dos compostos adicionados à matriz e do método de processamento. Os materiais a base de amido podem ser produzidos de maneiras diferentes, gerando filmes ou revestimentos. As embalagens no formato de filmes são estruturas finas pré-formadas em formato de película, que normalmente são produzidos pela técnica de *casting* ou por extrusão, e são utilizadas para embalar os alimentos (REIS et al., 2017; MALI et al., 2004). Já os revestimentos são formados diretamente sobre o alimento, onde o alimento pode ser submerso na solução filmogênica ou através da aspensão da solução sobre o alimento. Esta técnica é utilizada em alimentos individuais e que normalmente não possuem proteção natural (ZHONG; CAVENDER; ZHAO, 2014).

Durante o processamento pela técnica do tipo *casting*, ocorre gelatinização térmica dos grânulos de amido, em excesso de água, com dispersão da amilose e da amilopectina em solução aquosa. Em uma etapa subsequente, as estruturas se reorganizam durante a secagem formando uma matriz contínua que dá origem aos filmes de amido (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010). A técnica do tipo *casting* requer alguns cuidados durante o processo, como o controle rigoroso da forma do suporte e do nível da estufa, para evitar diferenças na espessura provocadas por desníveis durante a secagem (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

A aplicação desses filmes em alimentos em escala comercial ainda é limitada e depende de fatores como preço, processos de produção e estudo das propriedades e dos materiais utilizados (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

3.6 *Euphorbia umbellata* (PAX) Bruyns

O gênero *Euphorbia* apresenta cerca de 2000 espécies, sendo um dos maiores entre as Angiospermas (HORN et al., 2012). Encontram-se distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre. A espécie *Euphorbia umbellata* é conhecida também pela sinonímia científica de *Synadenium grantii*, popularmente conhecida no sul do Brasil como janaúba ou leitossinha (MINOZZO et al., 2016; MUNHOZ et al., 2014; MOTA et al., 2012). É um arbusto de origem africana que geralmente cresce de 3 a 5 metros de altura, e se constitui de um caule cilíndrico, com cicatrizes foliares proeminentes em hastes verdes e com látex abundante (NICHOLSON, 2008).

Macroscopicamente, as folhas são verdes, mais claras na face abaxial, simples, pecioladas e perinervadas, apresentando forma lanceolada (Figura 2) (LUZ et al., 2015).

Figura 2 - *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns no habitat



Fonte: Minozzo, 2016

O interesse pelas propriedades da planta se dá possivelmente devido à grande variedade da sua composição química e pela ampla distribuição. Devido ao fato de ser uma planta que se adapta a diversos habitat, metabólitos secundários são produzidos para sua

sobrevivência e defesa. Há relatos da presença de alcaloides, saponinas, terpenos e compostos fenólicos, incluindo flavonoides e taninos (MWINE; VAN DAMME, 2011).

Algumas partes da planta como látex, folhas e caule são utilizados para usos medicinais, mas poucos estudos descrevem sua composição química e atividades biológicas (LEMES et al., 2018; VALADÃO et al., 2018; MINOZZO et al., 2016; LUZ et al., 2015; MUNHOZ et al., 2014).

Os compostos fenólicos são comumente encontrados no gênero *Euphorbia*. Estudo recente da fração metanólica das cascas da *Euphorbia umbellata*, por meio de análises químicas desse material revelaram a presença de derivados de ácido elágico, gálico e flavonóis (compostos fenólicos) que apresentaram uma boa atividade antioxidante sobre diversos métodos *in vitro* testados, como DPPH[•], ABTS^{•+}, ânion superóxido, taurina cloramina e ácido hipocloroso (MINOZZO et al., 2016).

Alguns metabólitos também foram encontrados no extrato bruto da casca (taninos, cumarinas e antraquinonas) (COSTA et al., 2012). A investigação fitoquímica das cascas de *Euphorbia umbellata*, resultou no isolamento de friedelina, 3 β -friedelinol, eufol e lanosterol (MUNHOZ et al., 2014) e a incorporação de quantidades crescentes da fração metanólica da *Euphorbia umbellata* a membranas de quitosana demonstrou que esses compostos ativos eram liberados de forma controlada apresentando atividade antioxidante e antimicrobiana (LEMES et al., 2018).

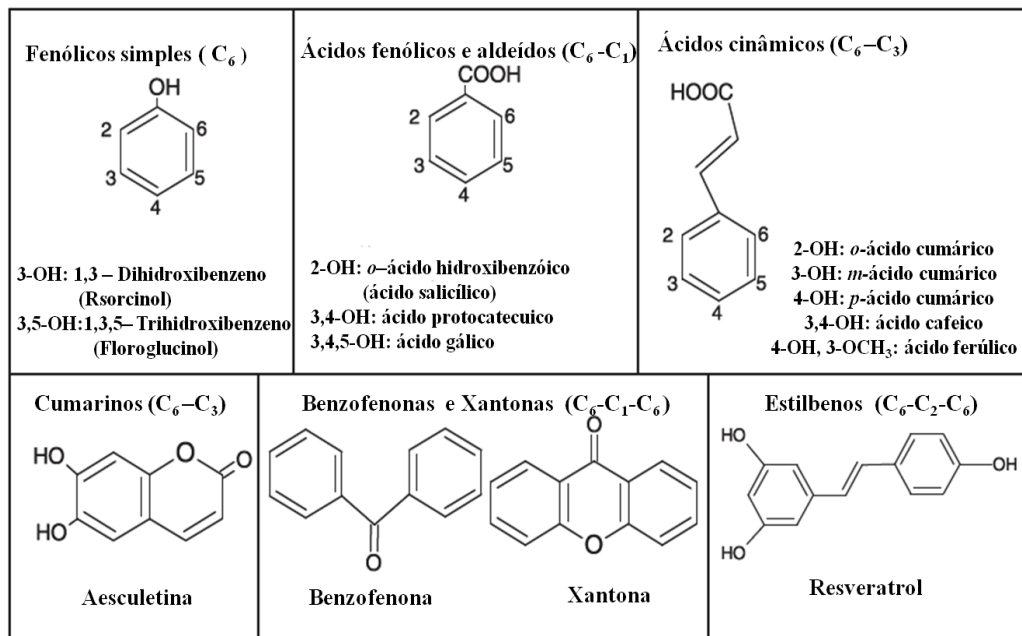
3.7 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos possuem ao menos um grupo hidroxila ligado ao anel aromático e podem variar desde moléculas simples tais como os ácidos fenólicos, até compostos altamente polimerizados, tais como taninos. Apresentam mais de 8.000 substâncias já descritas e sua classificação é realizada conforme sua estrutura, número e posição dos seus grupos hidroxilas e outros grupos substituintes (COSTA et al., 2015).

Esse grande e complexo grupo faz parte da constituição de uma variedade de vegetais. Podem ser pigmentos, que dão a aparência colorida aos alimentos, ou produtos do metabolismo secundário, normalmente derivado de reações de defesa das plantas contra agressões do ambiente (TRESSERA-RIMBAU; LAMUELA-RAVENTOS; MORENO, 2018; TSAO, 2010).

Os compostos fenólicos são antioxidantes fortes que complementam as funções antioxidantes de vitaminas e enzimas, funcionando como defesa contra o estresse oxidativo causado pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO). Os compostos fenólicos apresentam diversidade molecular e podem ser classificados de acordo com os átomos de carbono (Figura 3). Os flavonoides possuem como estrutura básica duas cadeias fenila ligadas por 3 carbonos ($C_6-C_3-C_6$) e fazem parte de uma das classes mais diversificadas de metabólitos secundários do reino vegetal. Dentro da classe dos flavonoides podem-se observar subgrupos que podem ser denominados de flavonas, flavononas, flavonolíis, isoflavonas, flavonóis, antocianinas e outros (COSTA et al., 2015; TSAO, 2010).

Figura 3 - Exemplos representativos de compostos fenólicos



Fonte: Adaptado de Soto et al., 2011.

Os compostos fenólicos (entre eles os flavonoides) que ocorrem naturalmente têm um alto potencial como antioxidante para restaurar, conservar e reparar os danos celulares. Os compostos fenólicos têm sido cada vez mais estudados para aplicação com matéria prima na indústria de alimentos; esses compostos agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios, melhorando sua qualidade e o seu valor nutricional (CAROCHO; FERREIRA, 2013; HUANG; OU; PRIOR, 2005; KAHKONEN et al., 1999).

Relatos do estudo realizado com extratos *Marrubium peregrinum* demonstraram a correlação linear significativa entre os valores da concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante indicando que estes compostos contribuem para a forte atividade antioxidante avaliada (STANKOVI, 2011). Compostos fenólicos atuam de várias formas, como antioxidantes, combatendo os radicais livres, quelando metais de transição, interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica. Estudos realizados demonstraram resultados promissores e observaram significativa relação entre compostos fenólicos e atividade antimicrobiana (GOUDA; KAVITHA; SARADA, 2015). Munhoz et al. (2014) detectaram a presença de compostos fenólicos no extrato bruto das cascas do caule da *Euphorbia umbellata*, além de terpenos, conforme revelados por análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

3.8 Atividade antioxidante

Antioxidantes podem ser considerados como aqueles compostos que são capazes de diminuir ou prevenir significativamente a oxidação de outra substância, sendo que este deve ser encontrado em menor quantidade que a substância a ser oxidada. Dentre os diversos compostos que podem atuar nessa atividade, podem-se citar os compostos fenólicos, enzimas antioxidantes, ligações de ferro, proteínas transportadoras e outros compostos que afetam o sinal de expressão gênica (COSTA et al., 2015). Diversos produtos naturais podem inibir ou retardar a oxidação de duas formas: pela eliminação de radicais livres, sendo neste caso descrito como um antioxidante primário, ou por um mecanismo que não envolve uma atividade sequestrante direta de radicais livres, caso em que o composto é um antioxidante secundário.

Os compostos fenólicos são antioxidantes primários e interferem no processo de oxidação como terminadores de radicais livres e às vezes também como quelantes de metais (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). O resultado de reações químicas das cadeias longas dos ácidos graxos insaturados, que são oxidados em suas duplas ligações, resulta na formação de ácidos graxos de cadeias menores. Estes desencadeiam processos oxidativos que acabam por levar a condição de ranço, resultando em um alimento inaceitável para os consumidores. Como a oxidação geralmente inicia na superfície do alimento, utilizar embalagens ativas biodegradáveis incorporadas com agentes naturais que possam proteger o alimento da

ocorrência dessa reação, se torna uma forma promissora para proteger o alimento da rancificação (JONGJAREONRAK et al., 2008).

Extratos vegetais ricos em compostos fenólicos exibem atividade antioxidante através de vários mecanismos. No processamento de alimentos, os produtos antioxidantes são adicionados a embalagens para atrasar ou prevenir a oxidação do alimento, principalmente à oxidação lipídica (REIS et al., 2015).

Na maioria dos casos, é conveniente utilizar métodos diferentes para avaliar a atividade antioxidante de uma substância para que a confiabilidade dos dados esteja assegurada. Os ensaios de radical DPPH[•] são baseados na transferência de elétrons de uma molécula doadora ao referido radical. Este radical pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável, diamagnética, e que é dificilmente oxidado (PETERSON, 2001).

A ação *scavenger* sobre ABTS^{•+} se baseia na geração do cátion radical ABTS^{•+}, que apresenta coloração azul esverdeado, por meio da reação do ABTS^{•+} com persulfato de potássio. Com a adição de um antioxidante, como os compostos fenólicos, por exemplo, ocorre a redução do ABTS^{•+} a ABTS, promovendo a perda da coloração do meio reacional, possibilitando posterior leitura em espectrofotômetro (PELLEGRINI et al., 1999).

Complementarmente o método de FRAP está baseado no princípio de que o complexo de coloração roxo claro Fe³⁺-TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazeno) é reduzido a um complexo de coloração roxo intenso Fe²⁺-TPTZ pela ação de antioxidantes com aumento na absorvância em 593 nm (BENZIE; STRAIN, 1996). De maneira geral, existe uma correlação positiva entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante.

O ensaio DPPH[•] é um método simples e altamente sensível, consiste em um radical livre de nitrogênio; um removedor de radicais de prótons, como um antioxidante doador de hidrogênio, pode extinguir o DPPH[•], para gerar sua forma não radical (DPPH-H). O efeito antioxidante de um composto é proporcional ao desaparecimento do DPPH[•] nas amostras. Em relação ao ensaio FRAP, ele fornece resultados rápidos e reproduzíveis. Esse ensaio proporciona a capacidade antioxidante do composto alvo nas amostras analisadas com base na redução dos íons férrico para ferroso. O ensaio ABTS^{•+}, é aplicável em ambas as fases aquosa e lipídica a sua descoloração fornece informações sobre a atividade antioxidante dos produtos naturais. A descoloração pode ser medida com base na redução do radical cátion (EÇA; SARTORI; MENEGALLI, 2014).

3.9 Atividade antimicrobiana

Na área de alimentos, a resistência dos microrganismos frente a conservantes antibacterianos tem se tornado um problema, devido à deterioração desses. Em resposta a essa resistência, a procura por novos compostos com propriedades antibacterianas tem chamado a atenção das indústrias alimentícias. Muitos compostos fenólicos podem possuir esta atividade antimicrobiana, que está principalmente relacionada à inativação das enzimas celulares, além de mudanças na permeabilidade das membranas celulares (SHEN et al., 2014). Para a seleção de um antimicrobiano, deve ser considerada a eficácia contra o microrganismo alvo e também as possíveis interações entre eles e o biopolímero do filme e outros componentes alimentares presentes (CAMPOS; GERSCHENSON; FLORES, 2011).

Os antimicrobianos devem apresentar atividade contra microrganismos causadores de intoxicações alimentares. As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram positivos associados às doenças estafilocócicas, que podem provocar intoxicações alimentares (ARGUDIN; MENDOZA; RODICIO, 2010) e a *Escherichia coli* é um microrganismo Gram negativo não esporulado indicador de más condições higiênicas sanitárias na produção e na manipulação de alimentos.

Métodos de teste de susceptibilidade antimicrobiana e a descoberta de novos agentes antimicrobianos têm sido amplamente utilizados e continuam a ser desenvolvidos, devido ao aumento da resistência microbiana (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Alguns métodos para análises são utilizados como: métodos de diluição e de difusão. Os métodos de diluição são os mais adequados para a determinação dos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM), uma vez que oferecem a possibilidade de estimar a concentração do agente antimicrobiano testado no ágar (diluição em ágar) ou meio de caldo (macrodiluição ou microdiluição).

A microdiluição é um dos métodos mais básicos de teste de susceptibilidade antimicrobiana. O procedimento envolve a preparação de diluições do agente antimicrobiano em um meio de crescimento líquido utilizando placa de microtitulação de 96 poços. A CIM é a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do organismo em tubos ou poços de microdiluição (CLSI, 2012).

No entanto, o ensaio de difusão em disco oferece muitas vantagens em relação a outros métodos: simplicidade, baixo custo, capacidade de testar números enormes de microrganismos e agentes antimicrobianos e a facilidade de interpretar os resultados fornecidos (GULMEZ et al., 2010). Durante o crescimento, as células microbianas secretam

moléculas que se difundem no ágar. Após a incubação, um disco é cortado de forma asséptica e depositado na superfície da placa previamente inoculada pelo microrganismo de ensaio. As substâncias se difundem para o meio, então, a atividade antimicrobiana das moléculas microbianas secretadas é detectada pelo aparecimento da zona de inibição ao redor do tampão de ágar (VALGAS et al., 2007).

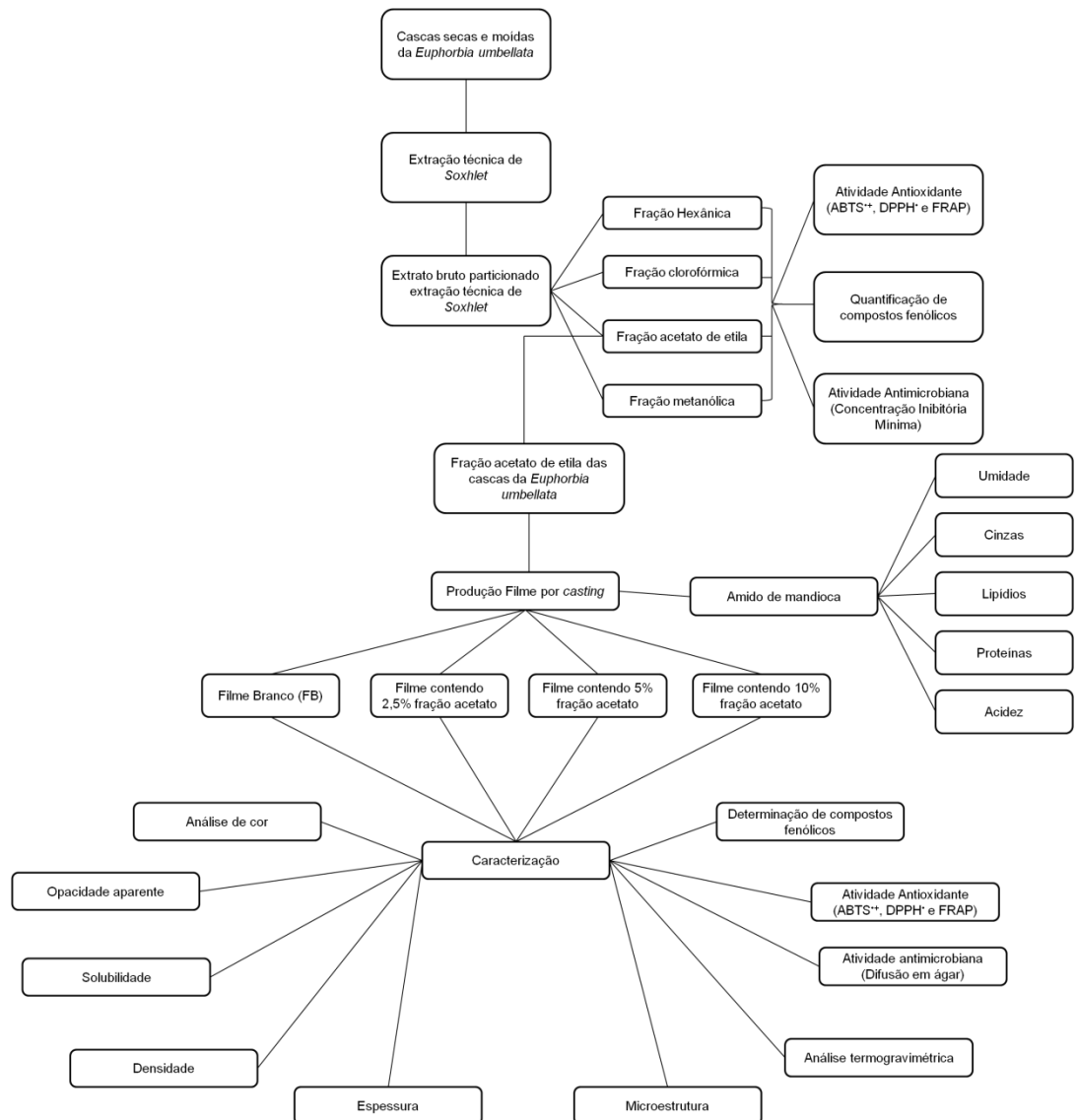
Além disso, vários métodos colorimétricos baseados no uso de reagentes corantes foram desenvolvidos. A utilização de sais de tetrazólio entre eles estão: Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), 5-hidrido de cloreto de ciano-2,3-ditoliltetrazólio (CTC), 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) - 5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazólio(XTT),4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazólio]-1,3-benzeno dissulfonato (WST-1), 2-(Cloreto de p-iodofenil)-3(p-nitrofenil)-5-feniltetrazólio (INT) ou 2,2'-dibenzotiazolil-5,5'-bis-[4-di (2-sulfoetil) carbamoilfenil]-3 , 3'-(3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenileno) ditetrazólio e sal dissódico (WST-5) (KREGIEL et al., 2008).

O TTC é um corante muito utilizado para contagem de colônias de microrganismos em meios de cultura sólidos, sendo um componente-chave do sistema de filme seco rehidratável usado para a análise microbiológica de alimentos. Esse corante é incolor na forma oxidada e vermelho quando reduzido por microrganismos, devido a formação de formazano (MORJAN et al., 2015). O TTC satisfaz vários critérios: preço baixo, velocidade de reação adequada e facilidade de leitura, portanto é considerado como um método comparativamente rápido para avaliar a atividade antibacteriana de agentes antimicrobianos (MOUSSA et al., 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Na Figura 4 é apresentado um fluxograma das atividades experimentais desenvolvidas no decorrer do trabalho.

Figura 4 - Fluxograma das atividades da etapa experimental



Fonte: a autora.

4.1 Coleta, identificação e processamento do material vegetal

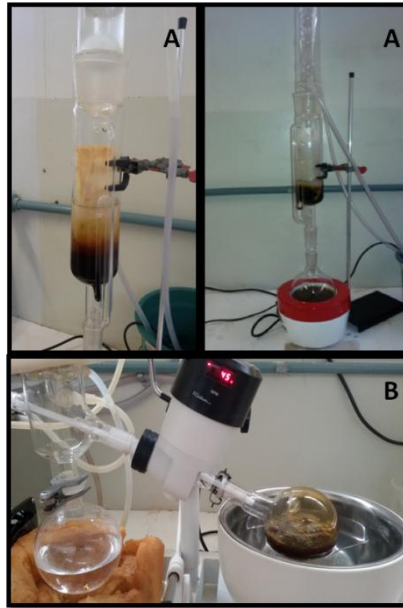
A coleta do material vegetal foi realizada em 2013, durante a primavera, na região da Ponta Grossa, (Coordenadas: 22 J 0584216 UTM 7222790 ELEVACÃO 902), Paraná, Brasil.

Uma excisata com um ramo florido da espécie (*Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns) foi preparada e posteriormente enviada ao Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba para classificação sistemática e posteriormente catalogada sob o número 363509. Com o auxílio de uma faca, as cascas dos galhos coletados foram mecanicamente removidas e separadas. Após isso se realizou processo de secagem, que foi feito ao ar livre (temperatura ambiente), na sombra por 14 dias. O local de secagem foi bem ventilado, protegido da poeira e do ataque de insetos e animais.

4.2 Obtenção das frações das cascas de *Euphorbia umbellata*

As cascas (201,34 g), após o processo de secagem, foram moídas com o auxílio de um liquidificador e submetidas à extração empregando-se a técnica de *Soxhlet* (Figura 3A). O líquido extrator (750 mL) foi constituído de uma mistura hidroalcoólica na porcentagem de 30:70 (água: etanol, v/v) e o processo de extração foi realizado por 24 horas. O solvente foi completamente removido em rotaevaporador (modelo 830, Fisatom[®], São Paulo, Brasil); banho-maria (modelo 558, Fisatom[®], São Paulo, Brasil); bomba de vácuo (modelo MA053, Marconi[®], Piracicaba, São Paulo, Brasil) (Figura 3B), obtendo-se 106,68 g de extrato bruto (EB). Todo o extrato bruto obtido foi particionado usando a mesma técnica (e tempo de extração), entretanto dessa vez, solventes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) foram empregados. As quatro frações foram concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida a 40°C (Figura 3B). Foram obtidos: a fração hexânica (FH), a fração clorofórmio (FCl), a fração metanólica (FM) e a fração acetato de etila (FA); esses foram liofilizadas (modelo LD1500, Terroni, São Carlos, Brasil) e acondicionadas em dessecador com sílica à temperatura 25°C, até o momento do uso (LEMES et al., 2018).

Figura 5 - (A) Extrator de Soxhlet, (B) rotaevaporador



Fonte: a autora

4.3 Estudo da atividade antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante, as amostras FH, FCI, FM e FA das cascas da *Euphorbia umbellata* foram solubilizadas em metanol na concentração inicial de 1mg/mL e realizadas diluições para concentrações de 0,1 mg/mL e 0,01mg/mL. Os métodos aplicados para determinação da atividade antioxidante incluem o ABTS^{•+}, DPPH[•] e FRAP.

4.3.1 Ação *scavenger* sobre ABTS^{•+}

O radical catiônico ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfônico) foi preparado utilizando 5 mL de solução aquosa de ABTS (7 mM) com 88 µL de persulfato de potássio (2,46 mM, Sigma-Aldrich[®]), deixando a reação ocorrer em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 12 a 16 horas antes do uso (RE et al., 1999). Antes do ensaio, a solução de ABTS^{•+} foi diluída com tampão fosfato de sódio 10 mM (1:20, v / v). As amostras das frações das cascas da *Euphorbia umbellata*, em concentrações entre 0,1 e 50 µg/mL em triplicata, foram adicionadas juntamente com ABTS^{•+} e tampão fosfato de sódio, completando um volume final de 1000 µL de meio reacional. A solução foi incubada durante 15 minutos a

25° C ao abrigo da luz e então foi realizada a leitura 734 nm em leitor de microplacas multi-modo híbrido Synergy™ H1 com software Gen5.2(BioTek®, USA).

4.3.2 Ação *scavenger* sobre DPPH*

Para a determinação da ação *scavenger* sobre DPPH* (2,2-difenil-1-picrilidrazilo Sigma-Aldrich®) o meio foi composto de uma amostra das frações (FH, FCl, FM e FA) solubilizadas em etanol absoluto com concentração entre 0,1-50 µg/mL, solução de DPPH* 60mM e o meio reacional completado para 1000 µL realizado em triplicata. A mistura foi incubada por 15 minutos a 25° C e ao abrigo da luz. A atividade antioxidante foi observada pelo decréscimo da absorbância em $\lambda = 530$ nm em leitor de microplacas multi-modo híbrido Synergy™ H1 com software Gen5.2 (BioTek®, USA) (SOARES et al., 1997).

4.3.3 Determinação do poder de redução do íon ferro FRAP

O ensaio FRAP foi realizado segundo metodologia de Benzie e Strain (1996). A solução tampão de acetato de sódio a 300 mM foi realizada adicionando 1,87 g de $C_2H_3NaO_2$ (acetato de sódio anidro) em 16 mL $C_2H_4O_2$ (ácido acético glacial) completando com água destilada o meio reacional para 1000 mL (pH 3,6). O preparo da solução 10 mM TPTZ (2, 4, 6 solução de tripiridil-s-triazina, Sigma-Aldrich®) foi realizado adicionando a massa de 0,03121g de TPTZ em 10 mL de HCl (ácido clorídrico) 40 mM. Seguindo o preparo da solução $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (cloreto de ferro, Biotec®) 20 mM. A nova solução de trabalho foi preparada misturando 60 mL de tampão acetato, 6 mL da solução de TPTZ e 6 mL de solução $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. As amostras FH, FCl, FA e FM (10 µL), em concentrações 1:1 até 1:1000 em triplicatas, foram permitidas reagir com 290 µL da solução FRAP por 30 min na condição escura. As leituras (complexo ferroso de tripiridil-triazina) foram então realizadas em $\lambda = 593$ nm em espectrofotômetro (BioTek® modelo ELx808 com agitador). O padrão Trolox foi utilizado para o desenvolvimento da curva de calibração (0-1000 µmol/L), os resultados foram expressos em µmol TE/g.

4.4 Determinação de compostos fenólicos nas frações

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada em triplicata de acordo com o método de Folin-Ciocalteau (Dinâmica®). As frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e

metanol (200 µL) foram dissolvidas em metanol (1 mg/mL) para obter uma solução de concentração igual a 20 mg/mL. A partir desta solução, foram retiradas alíquotas de 500 µL e adicionadas a balões de 10 mL (concentração final de 1 mg/mL). Em seguida, 200 µL desta diluição foram transferidos para um tubo de ensaio e combinados com 7 mL de água destilada, 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu e depois de 30 s, foram adicionados 2,5 mL de Na₂CO₃ 10,6% (m/v) (PA, Biotec[®]). Após 5 min de incubação à temperatura de 50°C, a absorbância foi medida em $\lambda = 715$ nm em leitor de microplacas multi-modo híbrido Synergy[™] H1 com software Gen5.2(BioTek[®], USA). A solução padrão de ácido gálico (Merck[®]) 50, 100, 200, 400, 600 e 800 µg/mL foi utilizado para o desenvolvimento da curva de calibração (MUNHOZ et al., 2014; SWAIN; HILLS, 1959). Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g).

4.5 Atividade Antimicrobiana

4.5.1 Preparo das concentrações das frações

Inicialmente preparou-se uma solução mãe com 40,0 mg de cada fração (FH, FCl, FA e FM) em 200 µL de dimetilsulfoxido (DMSO - Synth[®]). Em seguida foi realizada 6 diluições seriadas 1:2 em DMSO. Na sequência os extratos foram diluídos 1:10 em caldo Muller-Hinton (Difco[™]) para bactérias e testados frente aos microrganismos nas concentrações finais de 2000, 1000, 500, 250, 125 e 62,5 µg/mL. A concentração final de DMSO no meio foi de 0,5%.

4.5.2 Preparo dos microrganismos

Foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica* ATCC 14028. As cepas em estoque foram repicadas 24 horas antes da realização do experimento para serem ativadas em Ágar Muller-Hinton. Por ocasião dos testes as cepas foram preparadas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) de tal forma que continham 1,0 – 2,0 x 10⁸ UFC/mL para bactérias, equivalentes ao padrão 0,5 da escala de MacFarland. Em seguidas foram diluídas 1:10, e 10µL dos microrganismos assim preparados foram adicionados aos testes de atividade antimicrobiana (CLSI, 2014).

4.5.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi determinada pela técnica da microdiluição em placas de 96 cavidades, adaptada do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014). Adicionou-se 200µL dos extratos nas concentrações de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 µg/mL, nas cavidades da placa. Como controle utilizou-se 200µL do caldo com e sem 10µL de DMSO (diluído 1:2). Adicionou-se 10 µL de cada microrganismo teste às cavidades. Os testes foram realizados em triplicata e cada teste teve um branco equivalente, no teste equivalente ao branco não foi adicionado o microrganismo teste. Após o preparo, as placas foram recobertas com papel filtro, tampadas e incubadas em estufa a 35°C por 24 horas. Decorrido a incubação, a densidade óptica (equivalente à turvação produzida pelo crescimento dos microrganismos em caldo) foram realizadas 3 leituras pós agitação em 630 nm no leitor Synergy™ H1 com software Gen5.2. Para o cálculo foi feita a média das leituras descontando a média da leitura do branco correspondente.

4.6 Caracterização físico-química (composição centesimal) do amido de mandioca

4.6.1 Umidade

O amido de mandioca nativo foi obtido da Indemil (Paranavaí, Paraná, Brasil). As amostras foram embaladas em sacos plásticos com capacidade de 500g e armazenadas à temperatura ambiente. Para a análise de umidade, foram padronizados os pesa-filtros vazios durante 1 hora em estufa (Modelo 1306, Biomatic®, Porto Alegre, Brasil) a 105°C, sendo retirados e resfriados em dessecador até temperatura ambiente, foram pesados vazios. Em seguida foram adicionados aproximadamente 3 g de amostra (triplicata) e colocados na estufa (Modelo 1306, Biomatic®, Porto Alegre, Brasil) a 105°C até peso constante (IAL, 2008).

4.6.2 Resíduo mineral bruto (cinzas)

Foram padronizados os cadinhos vazios durante 1 hora em mufla (Modelo 0216, Fornitec®, São Paulo, Brasil) a 600°C, em seguida retirados e resfriados em dessecador até temperatura ambiente e então pesados vazios. Foram adicionados de 2 a 5g de amostra (realizado em triplicata) e anotado os pesos exatos, as amostras foram incineradas inicialmente no Bico de Bunsen. Os cadinhos foram colocados na mufla a 600°C até as

amostras adquirirem uma coloração branca acinzentada. Após este período, foram retirados os cadinhos da mufla, resfriados então pesados (peso exato) (IAL, 2008).

4.6.3 Lipídeos

Foi pesado um balão de fundo chato de 250 mL previamente padronizado em estufa a 105°C e resfriado em dessecador. Foram adicionados cerca de 5 g de amostra em papel filtro e presos para não perder as partículas da amostra. O balão com a amostra foi conectado ao conjunto de *Soxhlet*. Foi adicionado éter de petróleo (Biotec[®]) suficiente para a extração durante 4 h, sendo em seguida o solvente evaporado (rotaevaporador modelo 830, Fisatom[®], São Paulo, Brasil; banho-maria modelo 558, Fisatom[®], São Paulo, Brasil; bomba de vácuo modelo MA053, Marconi[®], Piracicaba, São Paulo, Brasil) e o balão colocado na estufa a 105°C por 1h, resfriado em dessecador e pesado (IAL, 2008).

4.6.4 Proteínas pelo Método de Kjeldahl (Nitrogênio total)

No tubo de digestão foram pesados aproximadamente 0,2 g de amostra (realizada em triplicata) e adicionados de 0,2 g de CuSO₄ (sulfato de cobre)(Dinâmica[®]), 1,0 g de K₂SO₄ (sulfato de potássio)(Synth[®]) e 5 mL de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) concentrado (Synth[®]), agitando cuidadosamente e misturando a amostra. A amostra foi aquecida gradativamente até atingir 400° C. A digestão foi completa quando a amostra apresentou coloração esverdeada e límpida. No destilador de Nitrogênio (Marconi, modelo MA036, Piracicaba, Brasil) após a diluição da amostra no tubo de digestão com 10 mL de água destilada, foi colocado um erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de H₃BO₃ 2% (ácido bórico) (Synth[®]) com indicador no suporte abaixo do condensador. O tubo da amostra foi encaixado no local apropriado e adicionado NaOH 50% (hidróxido de sódio) (Synth[®]) no funil dosador. A torneira do dosador foi aberta lentamente até neutralizar a amostra (cor azul escuro ou marrom escuro). Terminada a neutralização foram coletados 50 mL do destilado, em seguida foi feita a titulação com H₂SO₄ 0,02N padronizado. O fator de conversão de nitrogênio em proteína utilizado foi de 6,25 (IAL, 2008).

4.6.5 Acidez

Para análise do teor de acidez do amido de mandioca foram pesados cerca de 3 g de amostra (triplicata), transferida para erlenmeyer de 125 mL com o auxílio de 50 mL de água destilada e adicionado 3 gotas de solução de fenolftaleína. Em seguida, foi realizada a titulação com solução de NaOH 0,1M padronizada até o ponto de viragem (coloração rósea). O resultado foi expresso em porcentagem de acidez (IAL, 2008).

4.7 Preparo dos Filmes por *casting*

Para as diferentes formulações de filmes biodegradáveis mostradas na Tabela 1, foram utilizados 3% amido de mandioca (base seca), glicerol PA (Reatec[®]) na proporção de 20% em relação ao amido e diferentes concentrações da fração das cascas da *Euphorbia umbellata*. Os filmes de amido foram preparados pela técnica de *casting* adaptada de Gontard, Guilbert e Cuq (1992).

Tabela 1 - Componentes e quantidades utilizados na formulação dos filmes

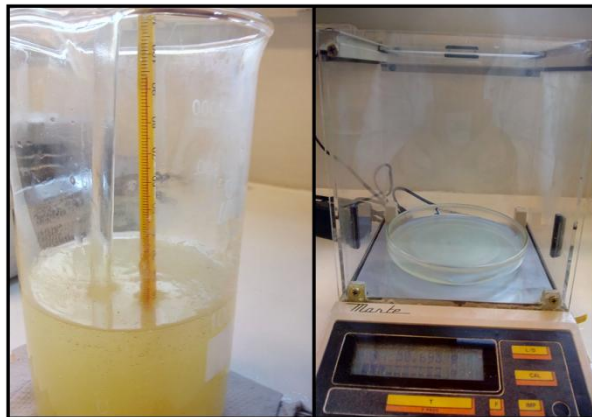
Filmes	Amido (g/100g)	*Glicerol (g/100g)	FA das cascas da <i>Euphorbia umbellata</i> (g/100g)	Água destilada (qsp 100mL)
FB	3,33	0,66	–	96,01
**F2,5FA	3,33	0,66	0,08	95,93
***F5FA	3,33	0,66	0,16	95,85
****F10FA	3,33	0,66	0,33	95,68

*20% em relação à massa do amido, ** 2,5% da FA das cascas da *Euphorbia umbellata* em relação à massa de amido, *** 5% da FA das cascas da *Euphorbia umbellata* em relação à massa de amido, ****10% da FA das cascas da *Euphorbia umbellata* em relação à massa de amido.

Fonte: a autora

A mistura foi aquecida gradativamente até atingir 95 °C, sob agitação constante, e vertida em placas redondas de acrílico (150x20mm) (Figura 4). As placas com a solução filmogênica foram então secas em estufa com circulação de ar, a 60 ° C, por 8 h. As películas secas foram removidas manualmente das placas e condicionadas em câmara tipo BOD (Tecnal[®], modelo TE-371, Piracicaba, Brasil) a 25°C.

Figura 6 - Produção dos filmes pela técnica de *casting*



Fonte : a autora

4.8 Caracterização dos filmes

Os filmes foram caracterizados quanto à opacidade, solubilidade, densidade, espessura, características estruturais por microscopia eletrônica de varredura (FEG), análise termogravimétrica (TGA), atividade antimicrobiana e atividade antioxidante.

4.8.1 Análise de cor

A cor de cada ensaio foi determinada por meio de um colorímetro (BYK Gardner-USA) em um ângulo de 10° usando o iluminante D65 (luz do dia). As leituras foram realizadas no sistema CIELAB (L^* , a^* e b^*), no qual L^* é o componente de claridade ou luminosidade, que varia de 0 a 100, e a^* e b^* são dois componentes de cor, cuja taxa varia de -100 a 100 (a^* varia de verde a vermelho e b^* de azul a amarelo). Para cada ensaio, foram realizadas dez leituras. Antes da realização de cada análise, efetuou-se a calibração do aparelho. Também foi utilizada a evolução do Índice de Brancura (IB). Esse índice é uma conversão dos parâmetros de L^* , a^* e b^* , sendo calculado segundo a Equação 1 (OLEYAEI et al., 2016).

$$IB = 100 - [(100 - L^*)^2 + (a^*)^2 + (b^*)^2]^{0,5} \quad (1)$$

4.8.2 Opacidade aparente

A opacidade aparente foi determinada com o auxílio de um colorímetro (BYK Gardner-USA) em um ângulo de 10 ° usando o iluminante D65 (luz do dia), seguindo os Hunterlab. O cálculo da opacidade (Y) foi realizado em relação à opacidade da amostra sobre um padrão branco (Y_b) e um preto (Y_p), conforme a Equação 2.

$$Y = (Y_p / Y_b) \times 100 \quad (2)$$

onde Y é a opacidade aparente, Y_p é a opacidade da amostra medida sobre um padrão preto e Y_b é a opacidade da amostra medida sobre um padrão branco.

O resultado foi dividido pela espessura, pois essa influência significativamente a opacidade das amostras, e expresso utilizando-se uma escala arbitrária (0 – 1 %/ μm). As amostras foram analisadas em triplicata (OLIVATO et al., 2014).

4.8.3 Solubilidade

Este teste foi conduzido de acordo com Reddy e Yang (2010), com algumas modificações. As amostras foram previamente dessecadas durante três dias em um dessecador contendo CaCl_2 anidro (Reatec[®]) (UR ~0). Depois de pesados, os filmes foram imersos em água destilada (razão 30: 1 água/amostra) durante 48 horas a 25 ° C. As amostras foram então removidas e secas usando as mesmas condições. O peso da amostra condicionada após o tratamento foi utilizado para determinar a % de solubilidade. As análises foram realizadas em triplicata.

4.8.4 Densidade

Para a determinação da densidade das amostras dos filmes foram cortadas com dimensões de 20 mm x 20 mm (triplicata) e acondicionadas por quinze dias em dessecador contendo cloreto de cálcio anidro (CaCl_2) para serem desidratadas. Posteriormente, sua massa e área foram determinadas. Os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo da densidade (gramatura) dos filmes, sendo expressos em g/cm^3 (MÜLLER; YAMASHITA; LAURINDO, 2008).

4.8.5 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada utilizando-se um micrômetro manual (Digimess, capacidade 0-25 mm, resolução 0,001 mm). A espessura final foi fixada como sendo a média aritmética de cerca de 10 medidas aleatórias realizadas de cada filme (MÜLLER; YAMASHITA; LAURINDO, 2008).

4.8.6 Microestrutura

A análise da microestrutura dos filmes foi realizada por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (*Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy* – FEG-SEM) utilizando microscópio eletrônico TESCAN (modelo Mira 3, Brno, República Tcheca). Amostras de cada filme foram imersas em nitrogênio líquido para congelamento rápido, fraturadas com auxílio de pinças e secas em dessecador com cloreto de cálcio (CaCl_2) por 3 semanas. As amostras secas foram submetidas à metalização com ouro em metalizador IC-50 Ion Coater (SHIMADZU, Quioto, Japão) e posteriormente analisadas (OLIVATO et al., 2015). Foram feitas imagens da superfície e fraturas das amostras.

4.8.7 Análise termogravimétrica (TGA)

Para a realização das análises térmicas foi utilizado o equipamento Setaram Instrumentation modelo Labsys Evo DTA/DSC. As amostras dos filmes foram secas em dessecador contendo cloreto de cálcio anidro por 15 dias antes das análises e foram pesadas aproximadamente 10 mg de cada amostra (amido de mandioca, FA e FB, F2,5FA, F5FA e F10FA), os quais foram acondicionados em cadinhos de platina. Os termogramas foram obtidos a uma taxa de aquecimento de 20°C/min, a faixa de temperatura foi de 20°C a 600°C com atmosfera de Argônio.

4.8.8 Atividade Antioxidante dos filmes

4.8.8.1 Preparo das amostras

As amostras foram obtidas de acordo com método de Alves, Mainardes e Khalil (2016) com adaptações. As alíquotas foram coletadas no tempo 0, 1, 3, 6 e 8 horas. Para tanto

foram preparadas amostras FB, F2,5FA, F5FA e F10FA, em quintuplicata, para cada tempo. Adicionou-se 10 mL de água Milli-Q[®] sobre cada filme (20mm x 20mm) em placa, e após o tempo determinado, o líquido foi coletado, liofilizado e armazenado até o momento das análises.

4.8.8.2 Ação *scavenger* sobre ABTS^{•+}

O radical catiônico ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfônico) foi preparado utilizando 5 mL de solução aquosa de ABTS (7 mM) com 88 µL de persulfato de potássio (2,46 mM, Sigma-Aldrich[®]), deixando a reação ocorrer em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 12 a 16 horas antes do uso (RE et al., 1999). Antes do ensaio, a solução de ABTS^{•+} foi diluída com tampão fosfato de sódio 10 mM (1:20, v/v). As amostras, conforme item 4.8.8.1, foram solubilizadas em metanol (Reatec[®]) em triplicatas. Alíquotas de 1, 5, 10, 20, 50 e 75 µL das amostras foram adicionadas a tubos eppendorf, juntamente com 300 µL de reagente ABTS^{•+}, e o volume foi completado para 1000 µL de meio reacional. As amostras foram incubadas durante 15 min, protegidas da luz à temperatura ambiente e a leitura 734 nm em leitor Synergy[™] H1 com software Gen5.2.

4.8.8.3 Ação *scavenger* sobre DPPH[•]

A atividade *scavenger* das amostras foi testada em relação a 60 mM de DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazil, Sigma-Aldrich[®]), que foi solubilizado em etanol absoluto (Reatec[®]). As amostras, conforme item 4.8.8.1, foram solubilizadas em etanol (PA, Reatec[®]) em triplicatas. O meio de reação foi composto por alíquotas de 1,5, 10, 20, 50 e 75 µL de amostra e 300 µL da solução de DPPH[•]. O volume foi completado com etanol a 1000 µL. A mistura foi incubada durante 15 min à temperatura ambiente e protegida da luz. A atividade foi observada pelo decréscimo da absorvância em 530 nm. A análise foi realizada utilizando um leitor Synergy[™] H1 com software Gen5.2 (LEMES et al., 2018).

4.8.8.4 Determinação do poder de redução do íon ferro FRAP

O ensaio FRAP foi realizado segundo metodologia de Benzie e Strain (1996), a solução tampão de acetato de sódio a 300 mM foi realizada adicionando 1,87 g de $C_2H_3NaO_2$ (acetato de sódio anidro) em 16 mL $C_2H_4O_2$ (ácido acético glacial) completando com água destilada o meio reacional para 1000 mL (pH 3,6). O preparo da solução 10 mM TPTZ (2, 4, 6 solução de tripiridil-s-triazina, Sigma-Aldrich[®]) foi realizado adicionando a massa de 0,03121g de TPTZ em 10 mL de HCl (ácido clorídrico) 40mM . Seguindo o preparo da solução $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (cloreto de ferro, Biotec[®]) 20mM. A nova solução de trabalho foi preparada misturando 60 mL de tampão acetato, 6mL da solução de TPTZ e 6 mL de solução $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. As amostras, conforme item 4.8.8.1, foram solubilizadas em metanol (PA, Reatec[®]) em triplicatas, foram permitidas reagir com 290 μ L da solução FRAP por 30 min na condição escura. As leituras (complexo ferroso de tripiridil-triazina) foram então realizadas em $\lambda = 593$ nm em espectrofotômetro (BioTek[®] modelo ELx808 com agitador). O padrão Trolox foi utilizado para o desenvolvimento da curva de calibração (0-1000 μ mol/L), os resultados foram expressos em μ mol TE/g.

4.8.8.5 Determinação de compostos fenólicos nos filmes

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada em triplicata de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (Dinâmica[®]). As amostras, conforme item 4.8.8.1, (20mm x 20mm) foram dissolvidas em metanol para obter uma solução de concentração final a 1mg/mL. Em seguida, 200 μ L desta diluição foram transferidos para um tubo de ensaio e combinados com 7 mL de água destilada, 500 μ L do reagente Folin-Ciocalteu e depois de 30 segundos, foram adicionados 2,5 mL de Na_2CO_3 10,6% (m/v) (PA, Biotec[®]). Após 5 minutos de incubação à temperatura de 50°C, a absorbância foi medida em $\lambda = 715$ nm em espectrofotômetro Biotek[®] leitor SynergyTM H1 com software Gen5.2. Os correspondentes perfis de liberação foram representados por gráficos do total de fenólicos liberados versus tempo, foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g) (LEMES et al., 2018).

4.8.9 Atividade Antimicrobiana

4.8.9.1 Método Difusão em ágar

O método foi realizado adaptado do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). As amostras dos filmes FB, F2,5FA, F5FA e F10FA foram avaliadas em relação aos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica* ATCC 14028. As cepas em estoque foram repicadas 24 horas antes da realização do experimento para serem ativadas em Ágar Muller-Hinton. Para realização dos testes as cepas foram preparadas em solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) (Farmax[®]) de tal forma que continham $1,0 \times 10^8$ UFC/mL para bactérias, equivalentes ao padrão 0,5 da escala de MacFarland. Em seguida foram semeadas em Ágar Muller-Hinton. Os filmes foram cortados em discos de 8 mm de diâmetro e colocadas no ágar inoculado. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. Após o período de incubação, as placas foram observadas quanto à homogeneidade de crescimento e à formação de zonas de inibição do crescimento, em seguida, mediu-se os diâmetros das zonas de crescimento de inibição. Posteriormente foi utilizado um corante Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) nas placas e foram incubadas durante 24 h a 37°C . A inibição do crescimento foi detectada pela adição de 20 µl de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) aquoso a 0,5% (Merck). O resultado foi análise do crescimento visível, como indicado pela mudança de cor TTC (vermelho para incolor).

4.10 Análise estatística

Os valores experimentais foram expressos em média \pm desvio padrão (DP). Os resultados densidade, espessura, solubilidade e opacidade aparente foram analisados por ANOVA e Teste Tukey, ao nível de significância de 5%, dados realizados pelo programa Graphpad Prism[®] 5.01 (Graphpad Software, Inc.). Os dados da atividade antioxidante foram avaliados por análise de variância ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni, ao nível de significância $p < 0,001$, dados realizados pelo programa Graphpad Prism[®] 5.01 (Graphpad Software, Inc.). Os dados da análise termogravimétrica foram analisados no software Origin 9.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Compostos fenólicos e Atividade Antioxidante das frações das cascas da *Euphorbia umbellata*

Para a quantificação dos compostos fenólicos nos extratos de *Euphorbia umbellata*, foi determinada inicialmente uma faixa de linearidade para determinação da absorbância pelas concentrações testadas. Para tanto, a curva de calibração de ácido gálico nas concentrações 50, 100, 200, 400, 600 e 800 $\mu\text{g/mL}$, foi preparada e se mostrou linear no intervalo proposto, com valor de $r^2 = 0,9991$ e equação da reta $y = 0,0009x + 0,0741$. Uma vez determinada a curva de calibração para o ácido gálico, buscou-se avaliar as frações (FH, FCl, FM e FA) obtidas das cascas de *Euphorbia umbellata* frente aos modelos antioxidantes ABTS^{•+}, DPPH[•], método de FRAP e paralelamente se realizou a determinação de compostos fenólicos presentes nas amostras avaliadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade antioxidante e compostos fenólicos das frações das cascas da *Euphorbia umbellata*

AMOSTRA	FRAP ($\mu\text{molTE/g}$)	ABTS ^{•+} (IC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$)	DPPH [•] (IC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$)	Compostos Fenólicos (mgGAE/g)
Fração Hexânica				
(FH)	–	–	–	9,51 ± 0,00
Fração Clorofórmica				
(FCl)	301,13 ± 0,03	58,00 ± 4,20	–	34,33 ± 0,00
Fração Acetato				
(FA)	2680,05 ± 0,02	1,40 ± 0,15	1,95 ± 0,00	515,81 ± 0,02
Fração Metanólica				
(FM)	1486,30 ± 0,01	2,10 ± 0,14	4,99 ± 1,75	364,70 ± 0,00

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão ($n=3$).

Fonte: a autora

O ensaio de determinação de compostos fenólicos nos extratos testados permitiu determinar que as frações mais polares apresentaram maiores quantidades desses compostos, sendo a FA mais compostos dessa classe que a FM. Os ensaios feitos em triplicata contra ABTS^{•+} mostram que a FA apresentou o mesmo nível de eficiência de captura apresentada no ensaio com DPPH[•]. Além de métodos para avaliar a atividade antioxidante que ocorrem em

meio orgânico, é interessante também fazer uso de outros métodos que avaliem a capacidade antioxidante, como o FRAP que ocorre em meio hidrofílico em condições ácidas. Nos dois primeiros ensaios, os radicais ABTS^{•+} e DPPH[•] são reduzidos (sendo isto mensurado por meio da perda de cor da solução) (CRAFT et al., 2012), entretanto, no ensaio de FRAP a redução dos íons Fe⁺³ (transferência de elétrons) é que é responsável pela mudança de coloração do meio (APAK et al., 2016). A atividade antioxidante é positivamente correlacionada à composição fenólica (ZARDO et al., 2015).

Extratos de materiais vegetais (frutos, casca, flores, folhas) ricos em compostos fenólicos estão sendo cada vez mais usados na indústria alimentícia por suas propriedades antioxidantes e eventuais benefícios para a saúde (ZENGIN et al., 2017; CHAUDHARI; MAHAJAN, 2015). Estudo com diferentes partes de vinte plantas medicinais avaliadas quanto ao teor de fenólicos e atividade antioxidante, permitiram determinar que os valores variaram de 12,21 a 355,25 (mgGAE/g; sendo que as amostras que apresentaram os maiores valores demonstraram também os maiores valores para atividades antioxidantes (avaliados por diferentes ensaios *in vitro*, como atividade antioxidante total, poder redutor de íons férricos, eliminação de radicais de óxido nítrico e atividade de eliminação de radicais livres de DPPH[•]) (CHAUDHARI; MAHAJAN, 2015).

Pesquisa realizada por Fu et al. (2014) com as cascas das sementes *Jatropha curcas* L. (pertencente à família Euphorbiaceae), demonstraram que os extratos mais polares (etanólico, acetato de etila e aquoso) dessa espécie vegetal contém altos teores de compostos fenólicos, sendo a fração acetato a que apresentou maiores concentrações (262,91 ± 8,35 mgGAE/g). Também foi determinado que a atividade antioxidante do extrato de acetato de etila frente ao radical ABTS^{•+} (1,92 ± 0,20 IC₅₀ µg/mL) e DPPH[•] (8,32 ± 0,11 IC₅₀ µg/mL) foi maior que os valores encontrados para as frações etanólica e aquosa. Os resultados do referido trabalho são semelhantes aos resultados encontrados para a FA (no presente estudo) que também demonstraram que a fração acetato de etila apresentou os melhores efeitos antioxidantes e a maior quantidade de fenólicos entre os extratos estudados.

Por fim, Lemes et al. (2018) desenvolveram membranas de quitosana incorporadas com a fração metanólica das cascas da *Euphorbia umbellata* utilizando a técnica de *casting* e avaliaram o poder antioxidante utilizando o mesmo método de Folin-Ciocalteu e determinaram que a quantidade de compostos fenólicos (318,64 ± 0,64 mgGAE/g) para a fração metanólica foi muito semelhante ao resultado dos fenólicos encontrados para a FM (364,70 ± 0,00 mgGAE/g) no nosso estudo.

5.2 Atividade Antimicrobiana das frações das cascas da *Euphorbia umbellata*

5.2.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As frações (FH, FCI, FA e FM) das cascas da *Euphorbia umbellata* foram submetidas à avaliação da atividade antibacteriana através do método de microdiluição em caldo a fim de se determinar a concentração inibitória mínima (CIM) frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica* ATCC 14028.

Para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, um coco Gram-positivo, a CIM₅₀ foi observada na concentração de 0,12 mg/mL para a FA destacando-se essa das demais frações (FM: CIM₅₀ de 0,50 mg/mL, FCI: CIM₅₀ de 0,50 mg/mL e FH: CIM₅₀ de 0,62 mg/mL). Para *Escherichia coli* ATCC 25922, um bacilo Gram-negativo, a FA também apresentou CIM₅₀ na concentração de 0,12 mg/mL, sendo determinado valor de CIM₅₀, para esse microrganismo apenas para a FCI (CIM₅₀ de 0,50 mg/mL); para FM e FH valores de inibição muito baixos foram determinados (concentração maior que 2,00 mg/mL). Os resultados do potencial antimicrobiano das FH, FCI, FA e FM das cascas da *Euphorbia umbellata* frente aos quatro microrganismos patogênicos são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Atividade antimicrobiana – CIM das frações das cascas da *Euphorbia umbellata*

AMOSTRA	Atividade antimicrobiana (mg/mL)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella entérica</i>
Fração Hexânica				
(FH)	0,62 ± 0,02	>2,00 ± 0,0	>2,00 ± 0,11	>2,00 ± 0,04
Fração Clorofórmica				
(FCI)	0,50 ± 0,19	0,50 ± 0,15	1,00 ± 0,03	1,00 ± 0,014
Fração Acetato				
(FA)	0,12 ± 0,14	0,12 ± 0,00	0,50 ± 0,05	1,00 ± 0,09
Fração Metanólica				
(FM)	0,50 ± 0,02	>2,00 ± 0,11	>2,00 ± 0,07	>2,00 ± 0,07

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (n=3).

Fonte: a autora

As quatro frações investigadas exibiram efeitos antimicrobianos consideráveis contra o microrganismo *Staphylococcus aureus*. A FA também mostrou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, apresentando resultados de CIM₅₀ de $0,12 \pm 0,00$ mg/mL e $0,50 \pm 0,05$ mg/mL, respectivamente. O potencial antibacteriano pode ser atribuído aos componentes bioativos presentes nos extratos da planta; no geral, a FA apresentou melhores atividades antibacterianas contra as cepas de microrganismos testados demonstrando um grande potencial quando comparado com as demais frações estudadas.

De acordo com Balouri; Sadiki; Ibsouda (2016) bactérias Gram-negativas possuem uma membrana celular quimicamente complexa e um de seus constituintes, o lipopolissacarídeo, determina a antigenicidade, toxicidade e patogenicidade destes microrganismos, justificando resultados menos interessantes para essa classe de microrganismos avaliados.

Há poucos relatos na literatura sobre a atividade antimicrobiana de *Euphorbia umbellata*. No entanto, vários estudos comprovam a atividade antimicrobiana de diferentes espécies do gênero *Euphorbia* (ASHRAF et al., 2015; ARAÚJO et al., 2014). Kumar; Mutyala; Raja, 2010 observaram extratos metanólicos e etanólicos da *Euphorbia hirta* e apresentaram significativa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas. Os extratos metanólicos e de acetato de etila da folha de *Euphorbia cotinifolia* apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (JAYALAKSHMI; RAVEESHA; AMRUTHESH, 2012).

No estudo de Siwe-Noundou et al. (2018) foi investigada a atividade antimicrobiana dos extratos de três partes da planta (folhas, caules e raízes) de *Alchornea laxiflora* (Benth.) Pax e K. Hoffm. (Euphorbiaceae), tendo sido preparados os extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila, etanólico e metanólico das cascas. Esses extratos foram testados contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*) e Gram-positivas (*S. aureus*) e os resultados da fração acetato de etila foram capazes de inibir o crescimento tanto das bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas.

5.3 Caracterização físico-química (composição centesimal) do amido de mandioca

Os resultados obtidos referentes à caracterização físico-química do amido de mandioca encontram-se na Tabela 4. A análise do teor de umidade mostrou que a amostra está

de acordo com o limite estabelecido pela Portaria Nº 554 de 30.08.1995 da Secretaria da Agricultura, do Abastecimento e Reforma Agrária (Brasil, 1995) que estabelece máximo de 14%. O controle da umidade é particularmente importante, já que umidade inferior a 14% dificulta a multiplicação microbiana (LOPES; FRANCO 2006). O teor de umidade encontrado nesse estudo para o amido foi de $9,67 \pm 0,10\%$ estando de acordo com o estabelecido pela legislação.

Com relação ao teor de minerais, o valor também se encontra dentro do limite fixado pela mesma legislação (Portaria Nº 554 de 30.08.1995 da Secretaria da Agricultura, do Abastecimento e Reforma Agrária (Brasil, 1995)). O amido em estudo apresentou teor de minerais igual a $0,76 \pm 0,12\%$, sendo que a legislação estabelece como limite aceitável um teor máximo de 1,5% de resíduo mineral bruto. O teor de minerais pode estar relacionado tanto com as características intrínsecas das raízes, quanto com o processo de fabricação ou durante o armazenamento. Valores elevados para cinzas podem indicar fraudes, como adição de areia, ou processamento inadequado, como lavagem e descascamento incompletos (FIORDA et al., 2013), características que não foram observadas na amostra avaliada.

Tabela 4 - Composição centesimal do amido de mandioca

Componentes	Amido de mandioca (%)	*Valor de Referência (%)
Umidade	$9,67 \pm 0,10$	14
Cinzas	$0,76 \pm 0,12$	1,5
Lipídeos	$0,26 \pm 0,02$	–
Proteína	$1,25 \pm 0,04$	–
Acidez	$0,70 \pm 0,01$	3

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($n=3$). * Valores limites conforme Portaria Nº 554 de 30.08.1995 da Secretaria da Agricultura, do Abastecimento e Reforma Agrária (Brasil, 1995).

Fonte: a autora

Com relação a proteínas e lipídios, os percentuais obtidos foram de $1,25 \pm 0,04\%$ e $0,26 \pm 0,02\%$ em base seca, respectivamente. Não há referências com relação aos teores de lipídeos e proteínas na legislação brasileira, entretanto Trombini et al. (2013) caracterizaram amido de mandioca para a elaboração de farinhas pré-gelatinizadas e obtiveram valores de 0,07% para cinzas, 0,11 % para lipídios, 0,44 % para proteínas. Em outro estudo (para a caracterização centesimal do amido de mandioca) foram encontrados valores de umidade de $12,65 \pm 0,01\%$; cinzas: $0,12 \pm 0,09\%$; lipídios: $1,56 \pm 0,00\%$; proteínas: $0,14 \pm 0,01\%$,

estando esses valores muito semelhantes aos estabelecidos pela legislação ou encontrados nos trabalhos que avaliam tais características (FIORDA et al., 2013). A diferença encontrada entre os resultados obtidos pelos autores citados e os encontrados no presente estudo, deve-se, provavelmente, a característica do cultivar de mandioca utilizado, época de plantio, tipo de solo e condições climáticas as quais a planta foi submetida durante o seu desenvolvimento (LEONEL; CEREDA, 2002).

5.4 Produção e caracterização dos filmes

No presente estudo a FA apresentou melhores resultados frente à atividade antioxidante e atividade antimicrobiana, tornando-se promissora para incorporação ao filme de amido de mandioca. Com base nisso, foram produzidos os seguintes filmes: FB (filme controle sem a fração acetato); F2,5FA (filme contendo 2,5% da fração acetato de etila da *Euphorbia umbellata*); F5FA (filme contendo 5% da fração acetato de etila da *Euphorbia umbellata*) e F10FA (filme contendo 10% da fração acetato de etila da *Euphorbia umbellata*).

5.4.1 Caracterização dos filmes quanto à densidade, espessura e solubilidade

A interação entre os aditivos incorporados na formulação pode influenciar a solubilidade dos filmes à base de amido, assim como em outras características dos filmes formados (MALI et al., 2004). Os resultados da solubilidade, espessura e densidade dos filmes são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Densidade, espessura e solubilidade dos filmes

AMOSTRAS	DENSIDADE (g/cm ³)	ESPESSURA (mm)	SOLUBILIDADE (%)
FB	1,24 ± 0,03 ^a	0,09 ± 0,01 ^a	28,69 ± 2,73 ^a
F2,5FA	1,61 ± 0,08 ^b	0,09 ± 0,01 ^{a,b}	24,04 ± 5,82 ^a
F5FA	1,52 ± 0,16 ^{a,b}	0,10 ± 0,01 ^{a,b}	17,95 ± 9,53 ^a
F10FA	1,49 ± 0,12 ^{a,b}	0,12 ± 0,01 ^c	26,69 ± 9,38 ^a

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão ($n=3$). As médias acompanhadas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentam diferença significativa (Teste de Tukey; $p<0,05$).

Fonte: a autora.

A solubilidade em água é um parâmetro importante para caracterização de um filme, pois pode afetar sua propriedade de resistência à água. Os resultados demonstram que a amostra F5FA apresentou valor de solubilidade ($17,95 \pm 9,53$ %), sendo o menor valor obtido para essa característica quando comparado com os resultados dos demais filmes. Já o resultado da densidade para essa amostra foi de $1,52 \pm 0,16$ g/cm³, destacando-se como o maior valor dentre os filmes analisados. Segundo Vercelheze et al. (2012) menores valores de densidade estão relacionados com maior solubilidade, fato explicado pela alta porosidade, a qual aumenta a capacidade de absorção de compostos líquidos. Os resultados nesse estudo estão de acordo com o postulado por Vercelheze e colaboradores (2012). Ainda, a característica de densidade deve ser baixa para os filmes formados, para que ocorra melhor solubilização do material (RIAZ et al., 2018), sendo que tal comportamento também foi observado no nosso estudo, no qual o aumento da adição da FA levou a um aumento da densidade e uma diminuição da solubilidade.

A solubilidade em água foi testada por Ochoa-Yepes et al. (2019) para as formulações de filmes produzidos pelos métodos de *casting*, extrusão e termocompressão, incorporadas com diferentes concentrações de proteínas de lentilha, onde se demonstrou o aumento desse parâmetro na amostra de filme obtida por *casting* comparado aos demais. Esse resultado era esperado devido à presença de grupos OH encontrados no filme produzido. Alta solubilidade para os materiais é vantajosa quando a embalagem é ingerida com o alimento ou

quando se deseja retirar a película do produto por lavagem ou cocção (FAKHOURI et al., 2015).

A espessura dos filmes pode ser ajustada controlando a relação entre o peso da solução filmogênica e a área da placa (VERSINO et al., 2016). Muller; Yamashita e Laurindo (2008), ao desenvolver filmes de amido mandioca com diferentes concentrações de glicerol como plastificante, apresentou resultados de espessuras dos filmes semelhantes aos resultados encontrados no presente estudo, sugerindo que maiores quantidades de sólidos presentes nas formulações fazem com que a espessura do filme formado seja maior (após o processo de secagem). Nesse estudo observou-se que o aumento da FA das cascas da *Euphorbia umbellata* ao filme ocasionava um aumento na espessura do filme.

5.4.2 Análise de cor e opacidade aparente

As propriedades óticas de filmes estão relacionadas à opacidade (transparência), cor e brilho, estando geralmente relacionados à imagem do produto. A opacidade desempenha também um papel muito importante, uma vez que determinados produtos, principalmente alimentícios, estão suscetíveis à fotodegradação, fazendo com que a embalagem seja uma importante ferramenta de barreira à ação da radiação ultravioleta (MARCOS et al., 2014).

Os resultados da análise de cor, índice de brancura e opacidade aparente dos filmes de amido de mandioca incorporados com diferentes concentrações da FA das cascas da *Euphorbia umbellata* são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Análise de cor, índice de brancura e opacidade aparente dos filmes

Formulações	L^*	a^*	b^*	IB (Índice de brancura)	Opacidade (%/μm)
FB	91,54 ± 0,09 ^a	-0,98 ± 0,02 ^a	0,48 ± 0,01 ^a	91,48 ± 0,04 ^a	0,19 ± 0,00 ^a
F2,5FA	90,69 ± 0,26 ^b	-2,69 ± 0,01 ^b	9,36 ± 0,08 ^b	86,52 ± 0,02 ^b	0,21 ± 0,00 ^b
F5FA	88,50 ± 0,79 ^c	-3,59 ± 0,14 ^c	15,43 ± 1,02 ^c	80,57 ± 0,01 ^c	0,19 ± 0,00 ^a
F10FA	87,06 ± 0,02 ^d	-4,57 ± 0,02 ^d	22,90 ± 0,03 ^d	73,30 ± 0,02 ^d	0,13 ± 0,00 ^c

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão ($n=3$). As médias acompanhadas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentam diferença significativa (Teste de Tukey; $p<0,05$). Para opacidade, os resultados estão expressos em escala arbitrária (0 – 1 %/μm).

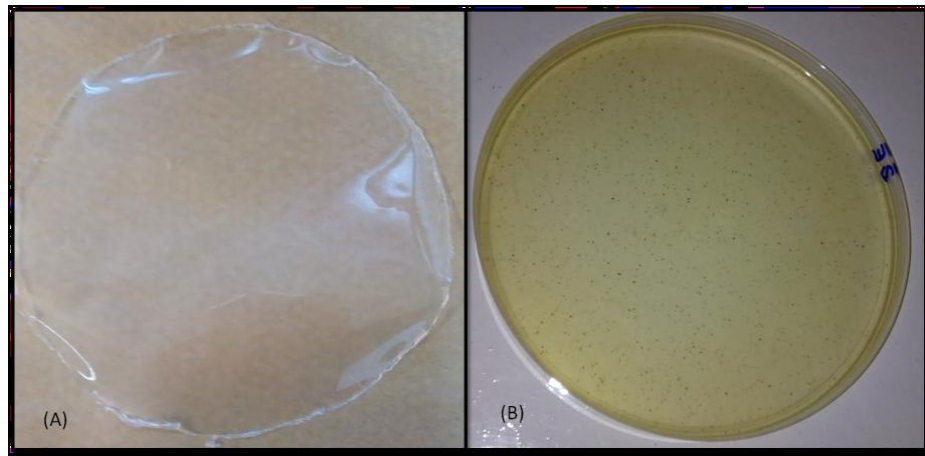
Fonte: a autora.

Foram evidenciadas diferenças na análise de cor, índice de brancura e opacidade dos filmes (teste de Tukey, $p < 0,05$). Os resultados foram expressos de acordo com a escala CIELAB. O resultado de L^* obtido para o FB confirma a claridade da amostra, pois indica a tendência de coloração clara/branco sendo os valores obtidos mais próximos de 100. O F10FA apresentou o menor valor de luminosidade e maiores valores de coordenadas a^* e b^* , indicando coloração mais escura e amarelada que a FB. Tal característica pode ser relacionada à incorporação da FA das cascas da *Euphorbia umbellata* aos filmes. Os resultados apresentados de índice de brancura para os filmes confirmam os dados descritos anteriormente, onde o aumento da concentração FA nos filmes levou a uma diminuição desse parâmetro.

Estudo realizado por Olivato et al. (2017) para o desenvolvimento de formulações de filmes termoplásticos de amido de mandioca incorporado com nanoargila de sepiolita em diferentes proporções, determinou que a adição desse componente em diferentes concentrações (0-5%) levou a alterações significativas na coloração dos filmes formados, assim como os resultados encontrados nesse trabalho. Um dos principais desafios ao incorporar materiais em filmes biodegradáveis está relacionado à alteração de cor e falta de transparência que podem advir da adição de diferentes materiais.

A opacidade está relacionada à quantidade de luz absorvida devido à dispersão dos compostos na matriz polimérica, sendo a aparência e a cor dependentes desse parâmetro, além de também ser influenciada pela espessura (FADINI et al., 2013). Neste sentido, no presente trabalho os valores de opacidade aparente das amostras foram calculados em função da espessura. A amostra controle FB apresentou opacidade próxima ao estabelecido para o filme F5FA, não apresentando diferença significativa entre as amostras. O filme F10FA apresentou opacidade aparente de $0,13 \pm 0,00 \text{ %}/\mu\text{m}$, menor valor comparado às demais formulações e justificado pelo aumento da concentração do extrato no filme. Os filmes apresentaram diferença visual em relação à cor e opacidade como podemos observar na Figura 7.

Figura 7 - (A) Filme amido + glicerol (FB) e (B) Filme amido + glicerol + FA das cascas da *Euphorbia umbellata* (PAX) BRUYNS (F10FA)



Fonte : a autor

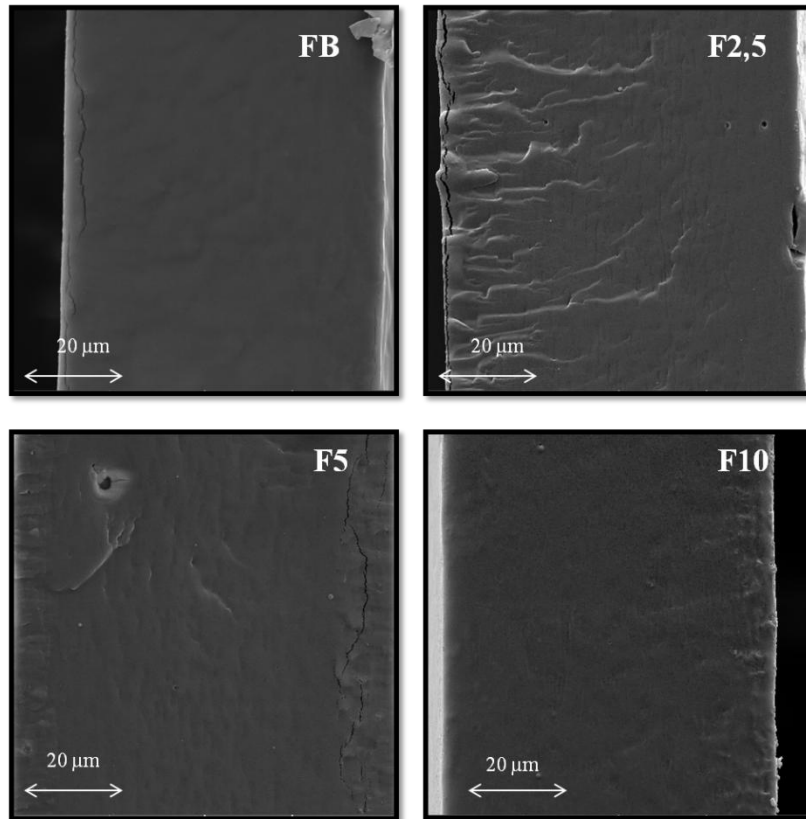
Bilck et al. (2015) encontraram valores de opacidade que variaram de 48,64% (filmes à base de amido com glicerol de grau técnico) a 50,60% (filmes com glicerol bi-distilado). Apesar da diferença de cor entre os diferentes graus de glicerol, não houve diferenças significativas na opacidade entre os filmes, o que é um resultado interessante quando o objetivo é a aplicação do filme como embalagem de alimentos.

5.4.3 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (*Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy*) (FEG)

Análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas nas áreas de fratura e superfície dos filmes à base de amido incorporados com diferentes concentrações de FA das cascas da *Euphorbia umbellata*, buscando identificar características como: homogeneidade do filme, estrutura das camadas, espaços vazios e suavidade da superfície.

Observa-se que a micrografia de fratura do FB apresentou-se lisa, compacta, mais densa e regular, indicando uma estrutura homogênea, a qual foi visualmente modificada após a adição da FA em concentrações diferentes ao filme (Figura 8).

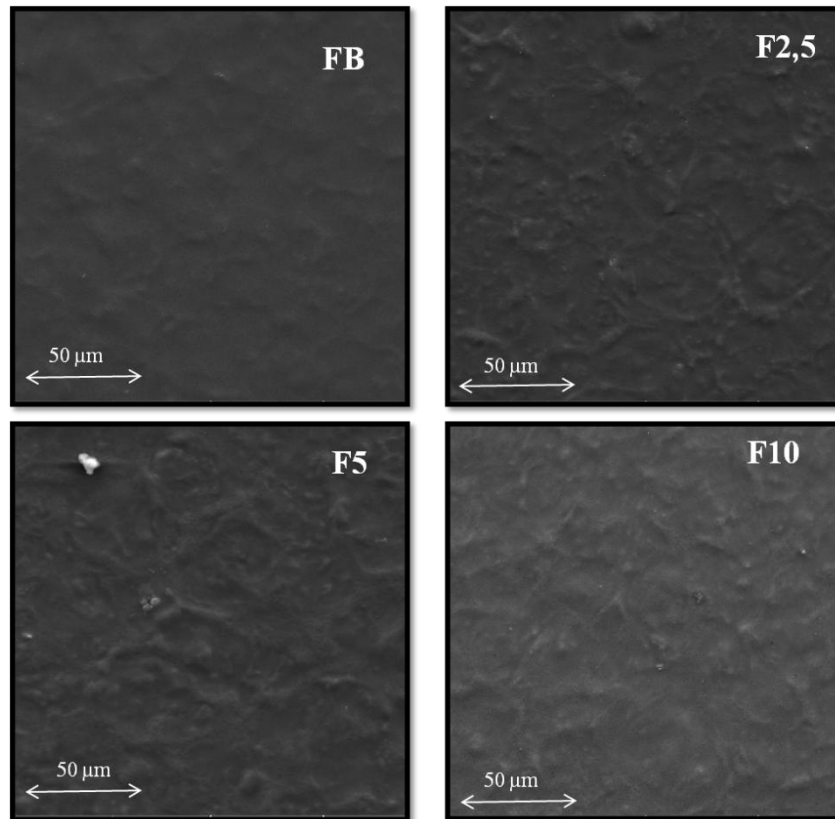
Figura 8 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas para a superfície de fratura das amostras (Ampliação 1600x)



Fonte: a autora

As análises das micrografias da superfície dos filmes FB e com as diferentes concentrações de FA, demonstraram que FB apresentou uma característica contínua, lisa e homogênea, sem poros, rachaduras ou irregularidades. Com o aumento da concentração de FA de 2,5 para 10%, a superfície do filme tornou-se mais heterogênea e observou-se aumento da característica rugosa, sugerindo que a adição do FA alterou a regularidade da matriz polimérica e influenciou na sua homogeneidade (Figura 9).

Figura 9 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas da superfície das amostras (Ampliação 800 x)



Fonte: a autora

Estudo desenvolvido por Shirai e colaboradores (2016) avaliou a incorporação de materiais em filmes à base de amido e concluiu que o aumento da proporção dos materiais incorporados à matriz leva ao aumento da rugosidade superficial. Tal fato também foi observado no presente estudo onde o aumento da concentração da fração acetato nos filmes ocasionou um aumento na sua rugosidade superficial. Jaramillo et al. (2017) ao analisarem por microscopia eletrônica de varredura os filmes de amido incorporados com extrato de manjerição, observaram que a adição do extrato ao filme levou à formação de rugosidade da superfície do filme, sendo atribuído pelos pesquisadores à presença de alguns sólidos de baixo peso molecular do extrato (que não são solúveis em água e migrariam para a superfície do filme). Tal observação poderia ser extrapolada a esse estudo, uma vez que os extratos vegetais de *Euphorbia umbellata* podem conter muitos compostos que não tenham solubilidade na formulação proposta.

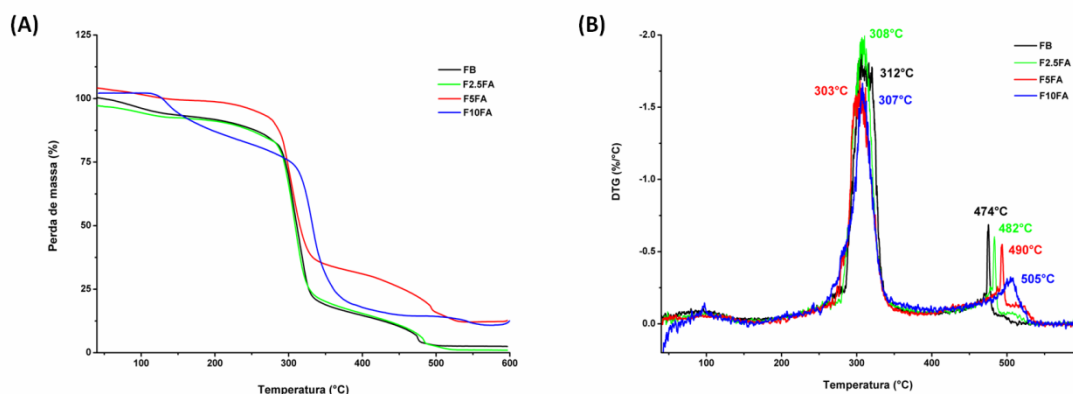
Lemes et al. (2018), ao incorporar extrato das cascas da *Euphorbia umbellata* em membranas de quitosana, observou nas análises avaliadas por microscopia eletrônica de varredura poros superficiais da membrana inerte (com diâmetros médios em torno de 1 µm) e aumento do tamanho superficial dos poros (em torno de 2 µm) conforme se aumentou a

quantidade de extrato adicionado a formulação. No presente trabalho não foi observado a formação de poros.

5.4.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica para filmes biodegradáveis tem sido largamente utilizada para avaliação da estabilidade térmica, determinação de conteúdo de umidade e de aditivos, estudos de cinética de degradação, análise de sistemas de copolímeros e estabilidade a oxidação e temperaturas de degradação. Pode-se observar na Figura 10 que as etapas de degradação térmica dos filmes produzidos ocorreram na faixa de temperatura entre 100° a 520°C, sendo encontrados três estágios.

Figura 10 - (A) Análise termogravimétrica e (B) curvas DTG dos filmes



Fonte: a autora

O primeiro estágio de degradação ocorreu entre 90 e 160°C, no qual ocorreu a perda gradual de água dos materiais; o segundo estágio ocorreu entre 300° a 312°C e está relacionado à decomposição do amido (amilose + amilopectina). O terceiro estágio entre 474° a 505°C pode ser atribuído à desidratação dos anéis sacarídeos, despolimerização e decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas dos filmes (ZHANG; ZHAO, 2015).

Nas curvas DTG dos filmes observa-se que a temperatura máxima de degradação foi de 312°C para o filme controle (FB), 308°C para F2,5FA, 303°C para F5FA e 307°C para F10FA. Nos filmes portadores de FA, as temperaturas de degradação foram afetadas e estes resultados possivelmente ocorreram devido ao aumento do teor de sólidos nas formulações (F2,5FA, F5FA e F10FA) e/ou as interações de hidrogênio entre as moléculas (GARCIA et

al., 2009). Este resultado foi semelhante à relatos na literatura (JARAMILLO et al., 2016), que concluíram que tal característica (redução da estabilidade térmica) pode contribuir para uma melhor biodegradabilidade dos materiais quando estes forem submetidos a processos de degradação em condições de descarte no meio ambiente.

A massa residual encontrada foi de 2,5% para FB, 0,99% para F2,5FA, 12,45% para F5FA e 12,40% para F10FA. O aumento do resíduo nas amostras com maior proporção de FA possivelmente deve-se ao fato da presença de componentes com anéis aromáticos, contidos na FA, que tendem a produzir alguns resíduos de carvão (JARAMILLO et al., 2016).

5.4.5 Determinação de compostos fenólicos liberados dos filmes

As amostras FB, F2,5FA, F5FA e F10FA, coletadas nos tempos 0, 1, 3, 6 e 8 horas, liofilizadas, foram dissolvidas em metanol para a obtenção de uma solução de concentração final 1mg/mL. Para determinação dos compostos fenólicos foi utilizada uma faixa de linearidade, a curva de calibração de ácido gálico nas concentrações 50, 100, 200, 400, 600 e 800 µg/mL, mostrou-se linear com valor de $r^2 = 0,9991$ e equação da reta $y = 0,0009x + 0,0741$. Os resultados do teor de fenólicos totais dos filmes são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Quantificação de compostos fenólicos dos filmes

Tempo	Compostos Fenólicos (mgGAE/g de amostra liberada)			
	Amostras			
	FB	F2,5FA	F5FA	F10FA
0 h	-	-	-	-
1 h	-	136,18 ± 0,01	11,74 ± 0,00	110,25 ± 0,00
3 h	-	292,36 ± 0,04	69,03 ± 0,02	222,73 ± 0,01
6 h	-	292,36 ± 0,04	69,03 ± 0,02	734,47 ± 0,05
8 h	-	292,36 ± 0,04	69,03 ± 0,02	1173,24 ± 0,03

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão ($n=3$).

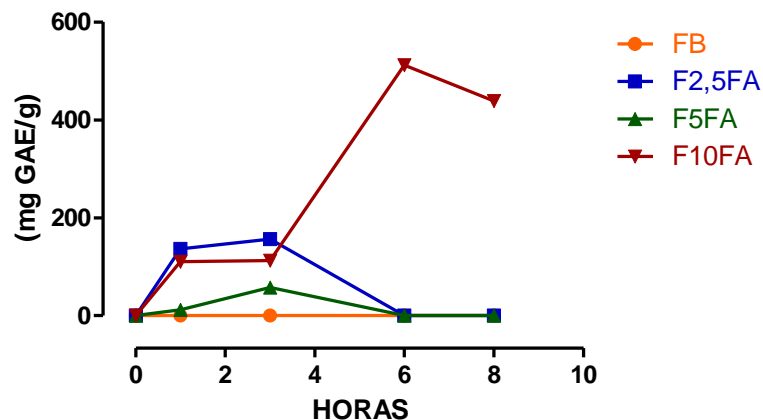
Fonte: a autora.

Considerando que a liberação do total dos compostos fenólicos adicionados na formulação seria de 478,95µg, teremos, ao final das 8 horas do teste, 0,07% dos compostos fenólicos liberados do filme contendo 2,5% da fração acetato. Para o filme contendo 5% da

fração acetato a liberação foi de 0,04% dos compostos ativos e o filme contendo 10% da fração acetato liberou 0,32% dos compostos fenólicos incorporados, após 8 horas.

Com relação ao monitoramento dos compostos fenólicos dos filmes observou-se que ocorreu migração desses compostos dos filmes dopados com o extrato. As amostras F2,5FA, F5FA e F10FA tiveram a liberação compostos fenólicos destacada no tempo de 3 horas, sendo que após esse tempo é possível se observar uma diminuição na liberação dos compostos a partir dos filmes. Já a amostra F10FA teve a liberação de fenólicos máxima no tempo de 6 horas e em seguida teve queda na liberação, conforme mostrado na Figura 11.

Figura 11 - Compostos fenólicos liberados dos filmes



Fonte :a autora

Como esperado, os compostos fenólicos migraram dos filmes para o meio, vários fatores podem influenciar o comportamento de liberação de compostos ativos de filmes de biopolímeros, incluindo a composição química dos compostos ativos, interações polímero-composto ativo, estrutura da matriz e condições do meio circundante (BUONOCORE et al., 2003). Nesse sentido, os polifenóis do extrato liberados no meio poderia ser atribuída à rápida penetração de água na matriz de amido de mandioca-glicerol, permitindo a difusão dos compostos ativos. Esse comportamento do filme pode ser útil para aplicações em que é necessário um tempo de liberação mais longo dos antioxidantes (PIÑEROS-FERNANDEZ et al., 2017).

De acordo com os resultados analisados observa-se que, com o aumento da concentração da FA incorporada nos filmes de amido, houve um aumento na liberação de

compostos fenólicos, corroborando os resultados já destacados anteriormente sobre os compostos fenólicos na FA do extrato das cascas da *Euphorbia umbellata*.

5.4.6 Atividade Antioxidante dos Filmes: ABTS^{•+}, DPPH[•] e FRAP

A avaliação do potencial de eliminação de radicais livres de uma substância é um método importante para determinar sua atividade antioxidante. Entre os métodos que detectam elétrons ou sequestro de radicais estão o ensaio de DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), o ensaio ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico), e o ensaio FRAP (EÇA; SARTORI; MENEGALLI, 2014). Os resultados da capacidade antioxidante dos filmes de amido de mandioca e glicerol incorporado com variadas concentrações da FA das cascas da *Euphorbia umbellata* elaborados por *casting* estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Atividade Antioxidante dos filmes

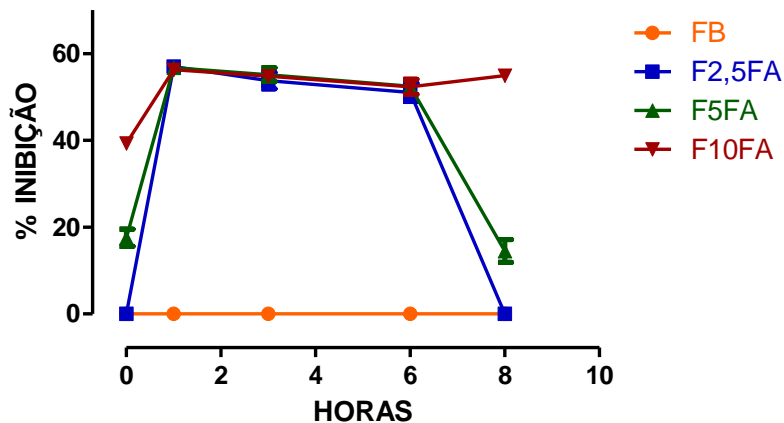
Amostra	Tempo	ABTS⁺ (% inibição)	DPPH[•] (% inibição)	FRAP ($\mu\text{molTE/g}$)
FB	0 h	-	-	-
	1 h	-	-	-
	3 h	-	-	-
	6 h	-	-	-
	8 h	-	-	-
F2,5FA	0 h	-	-	-
	1 h	57,03 \pm 1,46	93,18 \pm 0,88	-
	3 h	53,73 \pm 3,25	56,08 \pm 5,20	45,83 \pm 0,00
	6 h	51,06 \pm 3,67	56,17 \pm 0,10	9,58 \pm 0,00
	8 h	-	14,37 \pm 3,21	2,50 \pm 0,00
F5FA	0 h	17,56 \pm 3,42	-	-
	1 h	56,77 \pm 1,06	94,84 \pm 0,41	-
	3 h	55,15 \pm 2,77	94,80 \pm 1,83	-
	6 h	52,48 \pm 2,02	83,52 \pm 3,97	-
	8 h	14,50 \pm 4,54	41,61 \pm 1,44	9,58 \pm 0,00
F10FA	0 h	39,33 \pm 1,60	-	-
	1 h	56,27 \pm 1,91	95,10 \pm 1,06	205,41 \pm 0,01
	3 h	54,79 \pm 2,22	93,42 \pm 1,11	222,50 \pm 0,08
	6 h	52,33 \pm 3,04	75,11 \pm 0,54	135,41 \pm 0,01
	8 h	54,95 \pm 1,83	68,48 \pm 5,60	5,41 \pm 0,00

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média ($n=3$).

Fonte: a autora.

A atividade antioxidante das amostras FB, F2,5FA, F5FA e F10FA, coletadas nos tempos 0, 1, 3, 6 e 8 horas frente a ação *scavenger* ABTS⁺ demonstraram que nos tempos 1, 3 e 6 horas todos os filmes contendo extrato apresentaram inibição do radical ABTS⁺ (Figura 12). Ainda, nos tempos de 0 e 8 horas, os F5FA e F10FA tiveram captura do radical maior que o F2,5FA, sendo que o F10FA manteve diferença estatística em relação ao F5FA nesses mesmos tempos. Além disso, observa-se que o F10FA tem liberação de fenólicos por pelo menos 8 horas, conforme modelo desenvolvido.

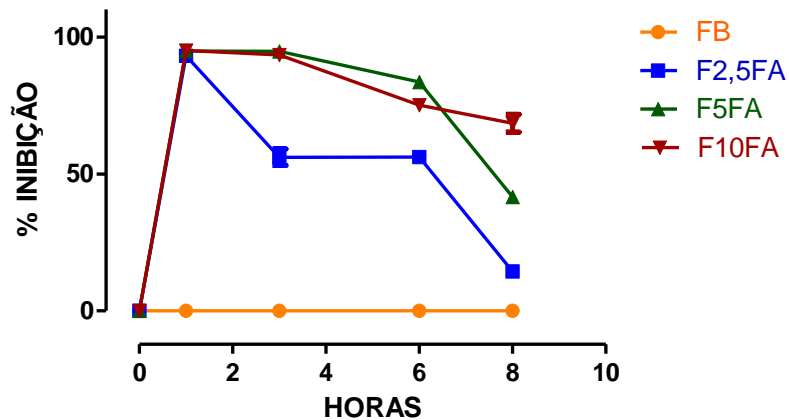
Figura 12 - Ação *scavenger* dos filmes sobre ABTS^{•+}



Fonte: a autora.

Semelhante aos resultados encontrados no presente estudo, Lemes et al. (2018) demonstraram que a atividade antioxidante das membranas de quitosana com extrato das cascas da *Euphorbia umbellata* (avaliadas frente ao ABTS^{•+}) mostraram melhor potencial antioxidante para as amostras incorporadas com maior concentração de extrato.

Pelo método de remoção do radical DPPH[•], as amostras F2,5FA, F5FA e F10FA apresentaram, no tempo de 3 horas, 95 % de inibição quando comparadas a amostra FB. Na Figura 13 observa-se que o teste do DPPH[•] de todos os filmes contendo a fração acetato nas diferentes concentrações apresentaram inibição significativamente maior que o filme branco (FB). Os F5FA e F10FA mostraram inibição maior que o F2,5FA nos tempos de 3, 6 e 8 horas. Enquanto o F10FA manteve captura significativa do radical DPPH[•] em todos os tempos avaliados, mostrando liberação de fenólicos em pelo menos 8 horas de experimento.

Figura 13 - Ação *scavenger* dos filmes sobre DPPH^{*}

Fonte: a autora

Lemes et al. (2018) avaliaram a atividade antioxidante (ABTS⁺⁺ e DPPH^{*}) do extrato das cascas da *Euphorbia umbellata* liberada das membranas de quitosana e foi detectado que as membranas contendo 50% e 100% de fração metanólica em relação a quantidade de quitosana apresentaram maiores níveis de atividade antioxidante (acima de 70% em comparação com a membrana 10% e a membrana inerte), e após 24 h de experimento, todas as amostras avaliadas não apresentaram aumento na % de inibição. Os resultados antioxidantes obtidos com os ensaios de ABTS⁺⁺, DPPH^{*} e da capacidade de redução férrica com filmes de sementes de manjeriço incorporados com óleo essencial de orégano demonstraram que houve um aumento considerável nessa característica conforme se aumentou da concentração do óleo (0-6%) (HASHEMIE; KHANEGHAH, 2017).

Na avaliação da atividade antioxidante frente o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH^{*}), foi determinado que o filme controle (FB) não apresentou atividade de remoção dos radicais, enquanto que com os filmes com diferentes concentrações de FA, foi possível se determinar valores decrescentes de atividade de remoção de radicais livres de DPPH^{*}.

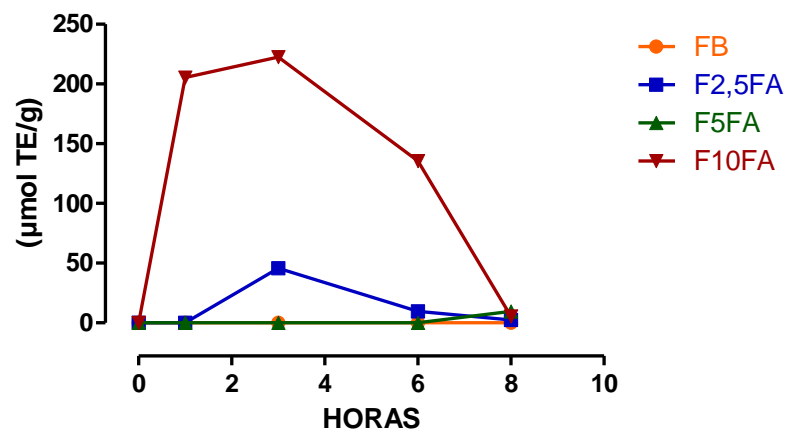
Marcos et al., (2014) analisaram atividade antioxidante frente a radicais DPPH^{*} de filmes contendo extrato de folhas de oliveira e observaram um aumento da capacidade antioxidante conforme se aumentou a concentração de extrato adicionado, demonstrando que

compostos presentes no extrato poderiam ser os responsáveis pela atividade avaliada e corroborando os resultados obtidos nessa pesquisa.

Em Piñeros-Hernandez et al. (2017) o teor de compostos fenólicos aumentou com o aumento da concentração do extrato incorporado a filmes a base de amido de mandioca e extrato de alecrim, apresentando resultados satisfatórios para atividade DPPH[•], corroborando e reforçando os dados obtidos no presente estudo.

Para determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP) foi utilizada a curva de calibração de Trolox (0-1000 µL) que se mostrou linear com valor de $r^2 = 0,9922$ e equação da reta $y = 0,0008x + 0,0181$. O F10FA obteve maior valor de ação antioxidante 222,5 µmolTE/g no tempo de 3 horas, ocorrendo uma queda após esse tempo, sendo diferente dos demais filmes produzidos. O F2,5FA apresentou valor 45,83 µmolTE/g no tempo 3 horas. Já as amostras FB e F5FA apresentaram os menores valores de ação antioxidante por esse método (Figura 14).

Figura 14 - A atividade antioxidante dos filmes frente ao método FRAP



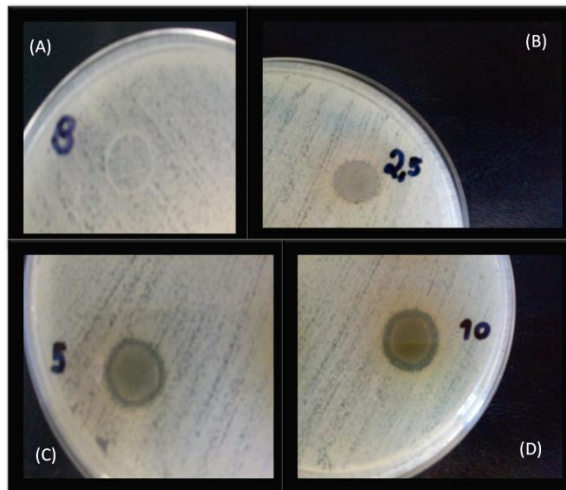
Fonte: a autora

A atividade antioxidante pelos métodos DPPH[•], ABTS^{•+} e FRAP dos filmes comprovaram a presença de compostos fenólicos na matriz polimérica. Este fato é interessante do ponto de vista industrial, pois a atividade antioxidante dos filmes ativos pode ser adaptada e diferentes aplicações podem ser encontradas para cada tipo de material.

5.4.7 Atividade Antimicrobiana - Método Difusão em Ágar

Após o período de incubação, as placas foram observadas quanto à homogeneidade de crescimento e à formação de zonas de inibição do crescimento. Foi realizada a medição dos halos, observando-se que para FB e F2,5FA não houve a formação de zonas de inibição de crescimento para nenhum microrganismo analisado. Entretanto, para as amostras F5FA e F10FA, os halos de inibição registrados foram de 12mm e 14mm respectivamente, para ambos os filmes frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Figura 15).

Figura 15 - Ágar Muller-Hinton semeadas com *Staphylococcus aureus* e discos de 8mm dos filmes. Resultado após 24 horas de incubação em estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. (A) FB, (B) F2,5FA, (C) F5FA (D) F10FA



Fonte : a autora

As zonas de inibição aumentaram com o aumento das concentrações de FA incorporados ao filme de amido (Tabela 9). Os maiores halos de inibição foram observados para bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*, enquanto os menores halos foram observados para a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*. Este resultado pode estar relacionado à presença de uma membrana externa adicional ao redor da parede celular das bactérias gram-negativas, o que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos através de sua cobertura lipoproteica (BURT, 2004). O mecanismo proposto da atividade antimicrobiana de compostos fenólicos de extratos vegetais possivelmente deve-se ao seu ataque à membrana celular, que causa aumento da permeabilidade e vazamento do citoplasma, ou em sua interação com enzimas localizadas na parede celular (SILVA et al., 2011).

Tabela 9 - Resultados observados para a Atividade Antimicrobiana dos filmes pelo método de difusão em ágar

AMOSTRAS	MICROORGANISMOS			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella enterica</i>
FB	-	-	-	-
F2,5FA	-	-	-	-
F5FA	* 12 ± 0,05	* 6 ± 0,07	-	-
F10FA	* 14 ± 0,06	* 8 ± 0,05	-	-

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão ($n=3$).

*Resultados dos halos de crescimento (mm), filmes (FB, F2,5FA, F5FA e F10FA) diâmetro de 8mm.

(-) Não houve formação de halo de inibição

Fonte: a autora

Filmes desenvolvidos à base de sementes de manjeriço e incorporados com diferentes concentrações de óleo essencial de orégano apresentaram resultados eficientes para bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, não sendo eficientes contra *Pseudomonas aeruginosa*, semelhantes aos resultados apresentados nesse trabalho.

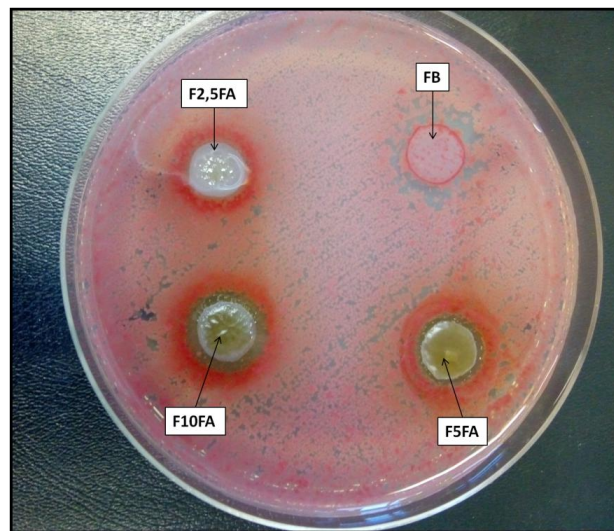
Estudo com membranas de quitosana incorporadas com extrato de cascas de *Euphorbia umbellata* apresentou resultados para atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em ágar, sendo dependente da concentração de extrato utilizado nas membranas. Membranas apresentando maiores concentrações de extratos apresentaram maior inibição frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus* entre 7,5-13 mm, para *Pseudomonas aeruginosa* halo de inibição de 10 mm para membranas contendo 50% e 100% de fração metanólica e para *Escherichia coli* não ocorreu formação de halo de inibição para nenhuma das membranas analisadas (LEMES et al., 2018).

Pelissari et al. (2009) demonstraram no estudo realizado com filmes de amido e quitosana incorporados com óleo essencial de orégano que o aumento da concentração de óleo essencial de orégano nas formulações apresentavam maiores halos de inibição para bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ($13,26 \pm 0,89 - 30,81 \pm 1,30$ mm), enquanto que para as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* foram menores $9,99 \pm 0,78 - 23,73 \pm 1,91$ mm.

Além da difusão dos compostos a partir dos filmes formados é importante que esse também mantenha a capacidade antimicrobiana em sua estrutura para que não venha a sofrer processo de contaminação. Assim, para se avaliar a característica citada, foi utilizado um corante (Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC)) com o objetivo de identificar o crescimento dos microrganismo na área dos discos dos filmes (FB, F2,5FA, F5FA e F10FA). O

mecanismo de ação do TTC baseia-se na formação de um sistema redox especial que atua comoceptor de prótons ou oxidante na presença de bactérias metabolicamente ativas. O TTC foi utilizado em todas as placas com os microrganismos e filmes, e verificou-se o crescimento de colônias de *Staphylococcus aureus* na área do filme FB, o que era esperado devido ao amido não apresentar atividade antimicrobiana, enquanto nos filmes F2,5FA, F5FA e F10FA não houve crescimento de colônias de *Staphylococcus aureus*, como demonstrado na Figura 16.

Figura 16 - Ágar Muller-Hinton semeadas com *Staphylococcus aureus* e discos de 8mm dos filmes resultado após 24 horas de incubação em estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ e com o corante (Cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólio (TTC))



Fonte : a autora

A inibição do crescimento celular ocorreu não só na zona periférica do disco com maior concentração do extrato, mas também na área do disco F2,5FA, possivelmente devido à concentração dos compostos fenólicos estarem em quantidade adequada para exercer essa ação na superfície do filme. Araújo et al. (2015) demonstraram que filmes de amido de mandioca incorporados com extrato etanólico de própolis exibiram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, mesmo em baixas concentrações de extrato (0,5%), principalmente devido a presença de compostos fenólicos.

Nouri e Nafchi (2014) analisaram a atividade antimicrobiana de filmes de amido incorporados com extratos das folhas de betel (*Piper betel* L.), utilizando bactérias gram-positivas e gram-negativas. Devido aos seus grupos hidroxílicos (compostos fenólicos) presentes nos compostos constituintes do extrato, foi observado um efeito inibidor contra o

crescimento de diversas bactérias testadas como, por exemplo, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, indicando resultados promissores como os determinados em nosso estudo.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos frente à quantificação de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante (DPPH[•], ABTS^{•+} e FRAP) e atividade antimicrobiana das frações (FH, FCl, FA e FM) das cascas da *Euphorbia umbellata*, a fração acetato (FA) mostrou melhores resultados, tornando-se promissora para incorporação ao filme de amido de mandioca. As análises da composição centesimal do amido de mandioca demonstraram que o amido obtido da fonte estudada está adequado aos parâmetros literários e da legislação, podendo ser utilizado para desenvolvimento de filmes biodegradáveis.

De modo geral, o aumento da concentração de FA incorporada ao filme de amido ocasionou redução nas propriedades de solubilidade e opacidade, e aumento na espessura e densidade dos filmes. Nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura observou-se que à medida que aumentava a concentração da FA ao filme, a superfície apresentava-se mais heterogênea e rugosa. Os resultados obtidos por TGA demonstraram que a adição da FA levou a diminuição na temperatura máxima de degradação da matriz polimérica, o que possivelmente indica que a fração está alterando-a e mudando o perfil de decomposição térmica dos materiais.

Os filmes apresentam compostos fenólicos em sua matriz polimérica, devido à adição da FA das cascas da *Euphorbia umbellata*. Sendo assim, comprovou-se pelos métodos ABTS^{•+} DPPH[•] e FRAP que os filmes produzidos possuem atividade antioxidante, mesmo depois de submetidos a uma temperatura elevada de processamento.

Os filmes de amido incorporados com a FA das cascas da *Euphorbia umbellata* mostraram resultados positivos para atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar, apresentando formação de zonas de inibição para bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e para a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. O filme produzido com 10% de FA obteve os melhores resultados para esta propriedade, mas foi observada atividade antimicrobiana mesmo na menor concentração de extrato no filme.

Os resultados apresentados neste estudo evidenciam que o desenvolvimento de filmes de amido incorporados com a FA das cascas da *Euphorbia umbellata* é uma alternativa interessante para a produção e aplicação de embalagens ativas antioxidantes em alimentos.

7 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Novos estudos podem ser feitos a partir da aplicação dos filmes elaborados neste trabalho em produtos alimentícios ou frutos ou vegetais, alimentos com umidades e composição diferentes, a fim de avaliar sua adaptação e resistência.

Como também a biodegradabilidade do filme poderia ser avaliada em condições controladas em função do tempo, quanto a perda de massa do alimento embalado.

REFERÊNCIAS

ALVES, A. de C. S.; MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M. Nanoencapsulation of gallic acid and evaluation of its cytotoxicity and antioxidant activity. **Materials Science & Engineering C**, v. 60, p. 126–134, 2016.

ARAUJO, G. K. P. DE; SOUZA, S. J. DE; SILVA, M. V. DA; YAMASHITA, F.; GONÇALVES, O. H.; LEIMANN, F. V.; SHIRAI, M. A. Physical, antimicrobial and antioxidant properties of starch-based film containing ethanolic propolis extract. **International Journal of Food Science and Technology**, v.50, p. 2080-2087, 2015.

ARGUDÍN, M. Á.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, p. 1751–1773, 2010.

ASHRAF, A.; ADIL, R.; ABID, M. Antioxidant, antimicrobial, antitumor, and cytotoxic activities of an important medicinal plant (*Euphorbia royleana*) from Pakistan. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 1, p. 109–115, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE AMIDO DE MANDIOCA – ABAM. Disponível em: <http://www.abam.com.br>. Acesso em: 18/ nov.2018.

ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard test methods for water vapor transmission of material – E-96-95**, Philadelphia: ASTM, 1995.

ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Test methods for tensile properties of thin plastic sheeting - D-882-91. **Annual book of ASTM**. Philadelphia: ASTM, 1996.

AVELLA, M.; VIEGGER J.J. De; ERRICO M.E.; FISCHER S.; VACCA P.; VOLPE M. G. Biodegradable starch/clay nanocomposites films for food packaging applications. **Food Chemistry**, v. 93, p. 467-474, 2005.

AVÉROUS, L., FRINGANT, C., MORO, L. Starch-based biodegradable materials suitable for thermoforming packaging. **Starch-Starke**, v. 53, p. 368–371, 2001.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BARBOSA-PEREIRA, L. et al. Development of antioxidant active films containing tocopherols to extend the shelf life of fish. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 236–243, 2013.

BENESI, M. T. et al. Genotype x environment interaction effects on native cassava starch quality and potential for starch use in the commercial sector. **African Crop Science Journal**, v. 12, n. 3, p. 205–216, 2004.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 239, n. 1, p.70-76, 1996.

BILCK, A. P. et al. Using glycerol produced from biodiesel as a plasticiser in extruded biodegradable films. **Polímeros**, v. 25, n. 4, p. 331–335, 2015.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente <http://www.mma.gov.br/responsabilidade-socioambiental/producao-e-consumo-sustentavel/consumo-consciente-deembalagem/impacto-das-embalagens-no-meio-ambiente>, acesso 16/07/2017 as 16:52

BRASIL. Portaria nº 554 de 30 de agosto de 1995. **Diário Oficial**. Brasília, Secretaria da Agricultura, do Abastecimento e Reforma Agrária. 1 Set., Seção 1.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–333, 1998.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods; A review. **Institute Journal Food Microbiology**, p 223–253, 2004.

CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N.; FLORES, S. K. Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. **Food Bioprocess Technol**, v.4, p. 849–875, 2011.

CAROCHO, M., FERREIRA I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p.15–25, 2013.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, v. 4, 2003.

CHISTÉ R. C.; COHEN, K.O.; MATHIAS, E. A.; RAMOA JÚNIOR., A. G. A. Qualidade da farinha de mandioca do grupo seca. **Ciência Tecnologia Alimentos**, Campinas, v .26. p. 861-864, out.-dez. 2006.

CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing – twenty fourth informational supplement. CLSI document M100-S24. 7. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; USA, 2014.

COPELAND, L.; BLAZEK, J.; SALMAN, J.; TANG, M. C. Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1527-1534, 2009.

COSTA, R. C.; CALVETE, E. O.; REGINATTO, F. H.; CECCHETTI, D.; LOSS, J. T.; RAMBO, A.; TESSARO, F. Telas de sombreamento na produção de morangueiro em ambiente protegido Shading screens in the production of strawberry in greenhouse. **Horticultura Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 98–102, 2011.

COSTA, L. L. G.; DAVID, V. C.; PINTO, R. M. C.; MINOZZO, B. R.; VITOLDO A. KOZLOWSKI, V. A. J.; CAMPOS, L. A.; SILVA, R. Z. e BELTRAME, F. L. Antiulcer

activity of *Synadenium grantii* latex. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 5, p. 1070-1078, 2012.

COSTA, D. C. et al. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v.45, p.336-354, 2015.

DAVIS, G.; SONG, J. H. Biodegradable packaging based on raw materials from crops and their impact on waste management. **Industrial Crops and Products**, v. 23, p. 147-161, 2006.

EÇA, K. S.; SARTORI, T.; MENEGALLI, F. C. Films and edible coatings containing antioxidants – a review. **Food Technology**, v. 17, n. 2, p. 98–112, 2014.

FADINI, A. L.; ROCHA, F. S.; ALVIM, I. D.; SADAHIRA, M. S.; QUEIROZ, M. B.; ALVES, R. M. V.; SILVA, L. B. Mechanical properties and water vapor permeability of hydrolyzed collagen-cocoa butter edible films plasticized with sucrose. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 2, p. 625–631, 2013.

FAKHOURI, F. M.; MARTELLI, S. M.; CAON, T.; VELASCO, J. I.; MEI, L. H. I. Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 109, p. 57–64, 2015.

FIORDA, F. A.; SOARES, M. S. Jr.; SILVA, F. A.; SOUTO, L. R. F.; GROSSMANN, M. V. E. Cassava bagasse flour: byproduct utilization and comparison with cassava starch. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 408-416, 2013.

GALGANO, F.; CONDELLI, N.; FAVA, F. T.; BIANCO, V. DI.; PERRETT, G.; CARUSO, M. C. Biodegradable packaging and edible coating for fresh-cut fruits and vegetables. **Italian Journal of Food Science**, v. 27, p. 1-20, 2015.

GARCIA, N. L. et al. Physico-Mechanical Properties of Biodegradable Starch Nanocomposites. **Macromolecular Materials and Engineering**, p. 169–177, 2009.

GOMEZ-ESTACA, J. G.; DICASTILLO, C. L.; MUNOZ, P. H. A.; GAVARA, R. C. R. Advances in antioxidant active food packaging. **Trends in Food Science e Technology**, v. 35, p. 42-51, 2014.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 53, n. 1, p. 206-211, 1992.

GOUDA, K. G. M.; KAVITHA, M. D.; SARADA, R. Antihyperglycemic, antioxidant and antimicrobial activities of the butanol extract from *Spirulina Platensis*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 5, p. 594–602, 2015.

GULMEZ, D. et al. Comparison of different antimicrobial susceptibility testing methods for *Stenotrophomonas maltophilia* and results of synergy testing. **Journal Infect Chemother**, v. 16, p. 322–328, 2010

HASHEMI, S. M. B.; MOUSAVI KHANEGHAH, A. Characterization of novel basil-seed

gum active edible films and coatings containing oregano essential oil. **Progress in Organic Coatings**, v. 110, p. 35–41, 2017.

HORN, J. W.; VAN E, B. W.; MORAWETZ, J. J.; RIINA, R.; STEINMANN, V. W.; BERRY, P. E.; WURDACK, K. J. Phylogenetics and the evolution of major structural characters in the giant genus *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 63, p. 305–326, 2012.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, 1841–1856, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 4^a ed. São Paulo, 1^o Ed. digital, 1002 p., 2008.

JARAMILLO, M. C. et al. Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 150–159, 2016.

JARAMILLO, C. M. et al. Active and smart biodegradable packaging based on starch and natural extracts. **Carbohydrate Polymers**, v. 176, n. May, p. 187–194, 2017.

JAYALAKSHMI, B; RAVEESHA, K. A; AMRUTHESH, K. N. Evaluation of antibacterial and antioxidant potential of *Euphorbia cotinifolia* linn. leaf extracts. **Scientific Paper**, p. 1-26, 2012.

JIANG, L.; WOLCOTT, M. P.; ZHANG, J. Study of Biodegradable Polylactide/Poly(butylene adipate-co-terephthalate) Blends. **Biomacromolecules**, v.7, p. 199–207, 2006.

JIMÉNEZ, A.; FABRA, M. J.; TALENS, P. Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. p. 2058–2076, 2012.

JONGJAREONRAKA, A.; BENJAKULA, S.; WONNOP VISESSANGUANB, W. e TANAKAC, M. Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and α -tocopherol. **Food Hydrocolloids**. v. 22, p. 449–458, 2008.

KAHKONEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J. P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S. e HEINONEN, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3954–3962, 1999.

KANATT, S. R.; RAMESH, C.; ARUN, S. Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 216–222, 2010.

KASEEM, M.; HAMAD, K. e DERI, F. Thermoplastic Starch Blends: A Review of Recent Works1 ISSN 0965545X, **Polymer Science**, v. 54, n. 2, p. 165–176, 2012.

KIM, H.; PARK, S. S.; LIM, S. Review - Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.126, p. 607–620, 2015.

- KREGIEL, D.; BERLOWSKA, J.; AMBROZIAK, W. Succinate Dehydrogenase Activity Assay in situ with Blue Tetrazolium Salt in Crabtree-Positive *Saccharomyces cerevisiae* Strain. **Food Technology And Biotechnology**, v. 46, n. 4, p. 376–380, 2008.
- KUMAR, O. A.; MUTYALA, L. N.; RAJA, K.G.R. Antibacterial evaluation of snake weed (*Euphorbia hirta* L). **Journal Phytology**, v. 2, p. 8-12, 2010.
- LAROTONDA, F.D.S.; MATSUI, K.N.; SOBRAL, P.J.A.; LAURINDO, J.B. Hygroscopicity and water vapor permeability of Kraft paper impregnated with starch acetate. **Journal of Food Engineering**, v.71, n.4, p.394-402, 2005.
- LECETA, I.; GUERRERO, P.; CABEZUDO, S.; CABA, K. D. La. Environmental assessment of chitosan-based films. **Journal of Cleaner Production**, v. 41, p. 312-318, 2013.
- LÉIS, C. M. et al. Environmental and energy analysis of biopolymer film based on cassava starch in Brazil. **Journal of Cleaner Production**, v. 143, 2017.
- LEMES, B. M. et al. Physicochemical, biological and release studies of chitosan membranes incorporated with *Euphorbia umbellata* fraction. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, n. 4, p. 433–443, 2018.
- LEONEL, M; CEREDA, M. P. Caracterização físico química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p.65-69, jan./abr. 2002.
- LOPES, E. A.; FRANCO, B. D. G. M. Influência do controle da etapa de molhagem dos grãos na qualidade microbiológica da farinha de trigo. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 2, p. 209-218, 2006.
- LUCKACHAN, G. e PILLAI, C.K.S. Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives. **Journal of polymers and the environment**, v.19, p.637-676, 2011.
- LUZ, L. E. C. et al. Cytotoxicity of latex and pharmacobotanical study of leaves and stem of *Euphorbia umbellata* (Janaúba). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 4, p. 344–352, 2015.
- MALI, S. et al. Barrier , mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 129–135, 2004.
- MALI, SUZANA; GROSSMANN, MARIA VICTÓRIA EIRAS; YAMASHITA, F. Filmes de amido : produção , propriedades e potencial de utilização. **Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 137–156, 2010.
- MANZANAREZ-LÓPEZ, F.; SOTO-VALDEZ, H.; AURAS, R. e PERALTA, E. Release of α -Tocopherol from poly(lactic acid) films, and its effect on the oxidative stability of soybean oil. **Journal of Food Engineering**, v.104, p. 508–517, 2011.
- MARCOS, B.; SARRAGA, C.; CASTELLARI, M.; KAPPEN, F.; SCHENNINK, G.; ARNAU. J. Development of biodegradable films with antioxidant properties based on

polyesters containing α -tocopherol and olive leaf extract for food packaging applications, **Food Packaging and Shelf Life** **1**, p. 140-150, 2014.

MARTIN, O.; SCHWACH, E.; AVÉROUS, L. AND COUTURIER, Y. Properties of Biodegradable Multilayer Films Based on Plasticized Wheat Starch. **Starch**, v. 53, p. 372–380, 2001.

MINOZZO, B. R.; LEMES, B. M.; JUSTO, A. DA S.; LARA, J. E.; PETRY, V. E. K.; FERNANDES, D.; BELLÓ, C.; VELLOSA, J. C. R.; CAMPAGNOLI, E. B.; NUNES, O. C.; KITAGAWA, R. R.; AVULA, B.; KHAN, I. A. E BELTRAME, F. L. Anti-ulcer mechanisms of polyphenols extract of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 29–40, 2016.

MORENO, O.; DÍAZ, R.; ATARÉS, L.; CHIRALT, A. Influence of the processing method and antimicrobial agents on properties of starch-gelatin biodegradable films. **Polymer International**, v. 65, n. 8, p. 905–914, 2016.

MOSCICKI, L.; MITRUS, M.; WÓJTOWICZ, A.; ONISZCZUK, T.; REJAK, A. and JANSSEN, L. Application of extrusion-cooking for processing of thermoplastic starch (TPS). **Food Research International**, v. 47, p. 291–299, 2012.

MOTA, M. F. Da; BENFICA, P. L.; BATISTA, A. C. B.; MARTINS, F. S. C.; PAULA, J. R. De; VALADARES, M. C. Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 319–329, 2012.

MORJAN, R.Y. et al. Synthesis, antibacterial and QSAR evaluation of 5-oxo and 5-thio derivatives of 1,4-disubstituted tetrazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 25, p. 4024–4028, 2015.

MOUSSA, S. H.; TAYEL, A. A.; AL-HASSAN, A. A.; FAROUK A. Tetrazolium/Formazan Test as an Efficient Method to Determine Fungal Chitosan Antimicrobial Activity. **Journal of Mycology**, 7p. 2013.

MOYER, R. A. et al. Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 519-525, 2002.

MÜLLER, C. M. O.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 82–87, 2008.

MUNHOZ, A.C.M., et al. Chemical and pharmacological investigation of the stem bark of *Synadenium grantii*. **Planta Medica**, v.80, p.458–464, 2014.

MWINE, J. T.; VAN DAMME, P. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 5, p. 652-662, Mar 2011.

NICHOLSON, M. J. *Euphorbia pseudograntii* Bruyns. In: Schemelzer, G. H. & Gurib-Fakim, A. (Editors). Prota 11 (1): Medicinal plants/Plantes médicinales 1. [CD-Rom]. PROTA, Wageningen, Netherlands. 2008.

NOURI, L. E NAFCHI, A. M. Antibacterial, mechanical, and barrier properties of sago starch film incorporated with betel leaves extract. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 66, p. 254–259, 2014.

OCHOA-YEPES, O. et al. Influence of process (extrusion / thermo-compression , casting) and lentil protein content on physicochemical properties of starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 208, n. 2018, p. 221–231, 2019.

OLEYAEI, A. S. et al. Modification of physicochemical and thermal properties of starch films by incorporation of TiO₂ nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 256–264, 2016.

OLIVATO, J. B.; MARINI, J.; POLLET, E. e YAMASHITA, F. Elaboration, morphology and properties of starch / polyester nano-biocomposites based on sepiolite clay. **Carbohydrate Polymers**, v. 118, p. 250-256, 2015.

OLIVATO, J. B.; MARINI, J.; POLLET, E. e YAMASHITA, F. Sepiolite as a promising nanoclay for nano-biocomposites based on starch and biodegradable polyesters. **Materials Science and Engineering**, v. 70, p. 296-302, 2017.

OLIVATO, J. B. et al. Physical and structural characterisation of starch/polyester blends with tartaric acid. **Materials Science and Engineering C**, v. 39, n. 1, p. 35–39, 2014.

PELLEGRINI, N. et al. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid radical cation decolorization assay. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 379-389, 1999.

PIÑEROS-HERNANDEZ, D. et al. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 488–495, 2017.

RAGUIN, A.; EBENHOH, O. Design starch: stochastic modeling of starch granule biogenesis. **Biochemical Society Transactions**, 2017 DOI: 10.1042/BST20160407

RAJEH, M. A. B. et al. Assessment of *Euphorbia hirta* L. leaf, flower, stem and root extracts for their antibacterial and antifungal activity and brine shrimp lethality. **Molecules**, v. 15, n. 9, p. 6008–6018, 2010.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-7, 1999.

REIS, L. C. B.; SOUZA, C. O.; SILVA, J. B. A.; MARTINS, A. C.; NUNES, I. L. e DRUZIAN, J. I. Active biocomposites of cassava starch: The effect of yerba mate extract and mango pulp as antioxidant additives on the properties and the stability of a packaged product. **Food and Bioproducts Processing**. v. 94, p. 382–391, 2015.

REIS, M. O. et al. Influence of microcrystalline cellulose in thermoplastic starch/polyester blown films. **Polímeros**, v. 27, n. 2, p. 129–135, 2017.

REN, J; FU, H; REN, T; YUAN, W. Preparation, characterization and properties of binary and ternary blends with thermoplastic starch, poly(lactic acid) and poly(butylene adipate-co-terephthalate). **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 576-582, 2009.

RIAZ, A. et al. Preparation and characterization of chitosan-based antimicrobial active food packaging film incorporated with apple peel polyphenols. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 547–555, 2018.

STANKOVI, M. S. TOTAL PHENOLIC CONTENT , FLAVONOID CONCENTRATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Marrubium peregrinum* L . EXTRACTS. **Kragujevac Journal of Science**, v. 33, p. 63–72, 2011.

SCHWACH, E. E AVÉROUS, L. Starch-based biodegradable blends:morphology and interface properties. **Polymer International**, v. 53, p. 2115–2124, 2004. DOI: 10.1002/pi.1636

SHAHIDI, F. e AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**. v. 18, p. 820–897, 2015.

SHEN, X.; SUN, X.; XIE, Q.; LIU, H.; ZHAO, Y.; PAN, Y.; HWANG, C.; WU, V. C. H. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 159–165, 2014.

SHI, R.; LIU, Q.; DING,T.; HAN, Y.; ZHANG, L.; CHEN, D. E TIAN, W. Ageing of soft thermoplastic starch with high glycerol content. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 103, p. 574–586, 2007.

SHIRAI, M. A. et al. Poly (lactic acid)/ thermoplastic starch sheets : effect of adipate esters on the morphological , mechanical and barrier properties. **Polímeros**, v. 26, n. 1, p. 66–73, 2016.

SILVA, L. C. Da; PEGORARO, K. A. ; PEREIRA, A. V. ; ESMERINO, L. A.; ASS, Q. B. C. ; BARISON, A. e BELTRAME, F. L. Antimicrobial activity of *Alternanthera brasiliana* Kuntze (Amaranthaceae): a biomonitored study. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n.1, p. 147-153, 2011.

SINGH, B.P.N; KULSHRESTHA, S.P. Kinetics of water sorption by soybean and pigeonpea grains. **Journal of Food Science**, v. 52, p.1538-1544, 1987

SIRACUSA, V.; ROCCULIB, P.; ROMANIB, S.; ROSA M. D. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science &Technology**, v. 19, p. 634-643, 2008.

SIWE-NOUNDOU, X. et al. South African Journal of Botany Biological activity of plant extracts and isolated compounds from *Alchornea laxiflora*: Anti-HIV , antibacterial and cytotoxicity evaluation. **South African Journal of Botany**, p. 6–11, 2018.

SOARES, J. R. *et al.* Antioxidant activities of some extracts of *Thymuszygis*. **Free Radical Research**, v. 26, p. 469-478, 1997.

SOBRAL, P.J.A.; MENEGALLI, F.C.; HUBINGER, M.D.; ROQUES, M.A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.423-432, 2001.

SOTO, L. M. *et al.* Recovery , concentration and purification of phenolic compounds by adsorption : A review. **Journal of Food Engineering**, v. 105, p. 1–27, 2011.

STANKOVI, M. S. Total phenolic content , flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L . extracts. **Kragujevac Journal of Science**, v. 33, p. 63–72, 2011.

SWAIN, T. e HILLS, W. E. The phenolic constituents of *Punnis domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal Science Food Agriculture**, v.19, p. 63-68, 1959.

TEIXEIRA, E. M.; CURVELO, A. A. S.; CORRÊA, A. C.; MARCONCINI, J. M.; GLENNC, G. M.; MATTOSO, L. H. C. Properties of thermoplastic starch from cassava bagasse and cassava starch and their blends with poly (lactic acid). **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 61–68, 2012.

TONNY, W.; UHIN, M. O.; ISLAM, R. e KHAN, R. A. Fabrication and characterization of biodegradable packaging films using starch and chitosan: effect of glycerol. **Journal of Chemical Engineering and Chemistry Research**. v. 1, n. 5, p. 343-352, 2014.

TRESSERRA-RIMBAU, A.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; MORENO, J. J. Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research. **Biochemical Pharmacology**, v.156, p.186–195, 2018.

TROMBINI, F. R. M.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Desenvolvimento de snacks extrusados a partir de misturas de farinha de soja, fécula e farelo de mandioca. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 1, p. 178- 184, 2013.

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients.**, v. 2, p. 1231-1246, 2010.

VALADÃO, A. C. L. *et al.* Reactivation of latent HIV-1 in vitro using an ethanolic extract from *Euphorbia umbellata* (Euphorbiaceae) latex. **Plos one**, p. 1–20, 2018.

VALGAS, C. *et al.* Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 369–380, 2007.

VERCELHEZE, A. E. S.; FAKHOURI, F. M.; DALL’ANTONIA, L. H.; YAMASHITA, F.; MALI, S. Properties of baked foams based on cassava starch, sugarcane bagasse fibers and montmorillonite. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1302–1310, 2012.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHEREM, F.; BEEST, M. V.; KRUIJF, N. DE e DEBEVERE, J. Developments in the active packaging of foods **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p.77-86, 1999.

VERSINO, F. et al. Starch-based films and food coatings : An overview. **Starch Journal**, v. 68, p. 1026–1037, 2016.

SOTO, L. M. et al. Recovery , concentration and purification of phenolic compounds by adsorption : A review. **Journal of Food Engineering**, v. 105, p. 1–27, 2011.

VILPOUX, O.F.; AVEROUS, L. Plásticos a base de amido. In: CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. (Ed.) **Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. Volume 3: Tecnologia, Usos e Potencialidades de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, capítulo 18, p. 499-529, 2003.

WESSLING, C. NIELSEN, T. E GIACIN, J. R. Antioxidant ability of BHT- and α -tocopherol impregnated LDPE film in packaging of oatmeal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 81: p.194 -201, 2000.

YANG, J.; GREY, K.; DONEY, J. An improved kinetics approach to describe the physical stability of amorphous solid dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 384, p.24-31, 2010.

ZARDO, D. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian apples. **Food and Nutrition Science**, v. 6, p. 227-235, 2015.

ZENGIN, G. et al. *Euphorbia denticulata* Lam .: A promising source of phyto-pharmaceuticals for the development of novel functional formulations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 27–36, 2017.

ZHANG, H.; ZHAO, Y. Preparation , characterization and evaluation of tea polyphenol e Zn complex loaded b -chitosan nanoparticles. **Food hydrocolloids**, v. 48, p. 260–273, 2015.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 49, p. 5165–5170, 2001.

ZHONG, Y.; CAVENDER, G.; ZHAO, Y. Investigation of different coating application methods on the performance of edible coatings on Mozzarella cheese. **Food Science and Technology**, v. 56, p. 1–8, 2014.